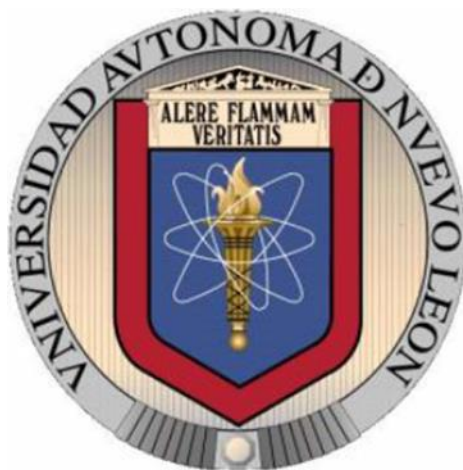


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS

**VÍA PARA LA RESOLUCIÓN DE LA PARADOJA DEL METANO
OCEÁNICO: PRODUCCIÓN AERÓBICA CONSTITUTIVA DE METANO
POR LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA C-P LIASA DESREGULADA DE
LA BACTERIA MARINA *Roseovarius nubinhibens***

PRESENTADA POR

ELIDA ESTEFANÍA LEE BAZALDÚA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

JUNIO, 2019

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



TESIS

**VÍA PARA LA RESOLUCIÓN DE LA PARADOJA DEL METANO
OCEÁNICO: PRODUCCIÓN AERÓBICA CONSTITUTIVA DE METANO
POR LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA C-P LIASA DESREGULADA DE
LA BACTERIA MARINA *Roseovarius nubinhibens***

PRESENTADA POR

ELIDA ESTEFANÍA LEE BAZALDÚA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

JUNIO, 2019

VÍA PARA LA RESOLUCIÓN DE LA PARADOJA DEL METANO OCEÁNICO:
PRODUCCIÓN AERÓBICA CONSTITUTIVA DE METANO POR LA ACTIVIDAD
DE LA ENZIMA C-P LIASA DESREGULADA DE LA BACTERIA MARINA
Roseovarius nubinhibens

Aprobación de Tesis:

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu
PRESIDENTE

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
SECRETARIO

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado
VOCAL

Dra. María Araceli Hernández Ramírez
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

VÍA PARA LA RESOLUCIÓN DE LA PARADOJA DEL METANO OCEÁNICO:
PRODUCCIÓN AERÓBICA CONSTITUTIVA DE METANO POR LA ACTIVIDAD
DE LA ENZIMA C-P LIASA DESREGULADA DE LA BACTERIA MARINA
Roseovarius nubinhibens

Revisión de Tesis:

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu
ASESOR

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
ASESOR EXTERNO

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado
COMITE TUTORIAL

Dr. Ulrico J. López Chuken
COMITE TUTORIAL

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
COMITE TUTORIAL

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por la beca otorgada y a la Universidad Autónoma de Nuevo León especialmente a la Facultad de Ciencias Químicas y al Laboratorio de Biotecnología 1 por el apoyo hacia el proyecto con todo el material y equipo necesario para su realización.

A mis maestros de maestría que gracias a su conocimiento tuve la oportunidad de aprender nuevas áreas de la ciencia que daba por desconocido.

A mis asesores que me fueron guiando a lo largo del proceso de aprendizaje y desarrollo de este trabajo de investigación. Sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

A mi director de tesis y amigo el Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto tan especial para mi y que desde el inicio él supo que sería feliz trabajando en él.

A mi co-asesora de tesis y amiga la Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal que me ha ido acompañando y guiando a lo largo de mi desarrollo como investigadora y que gracias a su apoyo sigo adelante por este bonito camino.

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio de Biotecnología 1 que fui conociendo a lo largo de estos dos años, en especial a mis amigas Alejandra, Anaid y Lorelay con las que siempre pude contar para cualquier cosa, las quiero mucho.

A todos mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biotecnología 3 por su apoyo cuando necesite utilizar algún equipo.

A mis compañeros y amigos de generación David, Arlette, Paco, Norberto, Silvia, Ricardo, Anette y Lorelay, por todos esos buenos momentos que pasamos juntos.

A Albert, fuiste una persona indispensable para mí a lo largo de estos 2 años de maestría, me apoyaste en todo momento, me ayudaste siempre que lo necesité y fuiste un soporte cuando las cosas no iban bien y te alegrabas cuando todo salía bien. En especial, gracias a ti y a tu maravillosa forma de ser.

A mis padres y a toda mi familia que han estado a mi lado en todo momento, los amo.

DEDICATORIA

A mis padres,
por su apoyo incondicional a través de las adversidades,
por su amor incondicional hacia mi,
por sus alegrías en los momentos buenos.
A ustedes que los amo con todo mi corazón y
siempre van a estar ahí a para mi.

Con todo mi amor su hija, Elida Estefanía Lee Bazaldúa

ÍNDICE GENERAL

Nomenclatura	1
Índice de figuras	4
Resumen	5
1. Introducción	7
2. Antecedentes	9
3. Aportación científica	15
4. Hipótesis	15
5. Objetivo general	15
6. Objetivos específicos	16
7. Materiales y métodos	16
7.1.Localización	16
7.2.Equipo	16
7.3.Reactivos	17
7.4.Métodos	17
7.4.1. Reactivación de la cepa comercial <i>R. nubinhibens</i> ISM en medio YTSS	17
7.4.2. Confirmación de la identidad de la cepa comercial <i>R. nubinhibens</i> ISM mediante la secuenciación del gen 16S	17
7.4.3. Caracterizar el crecimiento de <i>R. nubinhibens</i> ISM en medios naturales mediante un estudio cinético	18
7.4.4. Caracterizar el crecimiento de <i>R. nubinhibens</i> ISM en medio mínimo mediante un estudio cinético	19
7.4.5. Demostrar la capacidad de <i>R. nubinhibens</i> ISM para utilizar metilfosfonato como única fuente de fósforo	19
7.4.6. Cuantificación de metano producto de la degradación de metilfosfonato por la bacteria <i>R. nubinhibens</i> ISM	20
8. Resultados y Discusión	22
8.1.Reactivación de la cepa comercial <i>R. nubinhibens</i> ISM en medio YTSS	22
8.2.Confirmación de la identidad de la cepa comercial <i>R. nubinhibens</i> ISM mediante la secuenciación del gen 16S	22
8.3.Caracterización del crecimiento de <i>R. nubinhibens</i> ISM en medios naturales mediante un estudio cinético	24
8.4.Caracterización del crecimiento de <i>R. nubinhibens</i> ISM en medio mínimo mediante un estudio cinético	25

8.5.Demostrar la capacidad de <i>R. nubinhibens</i> ISM para utilizar metilfosfonato como única fuente de fósforo	26
8.6.Cuantificación de metano producto de la degradación de metilfosfonato por la bacteria <i>R. nubinhibens</i> ISM	32
9. Conclusión	37
10. Perspectivas	39
11. Bibliografía	40

NOMENCLATURA

ORGANISMOS

Roseovarius nubinhibens:

También conocida por su abreviación *R. nubinhibens*.

Escherichia coli:

También conocida por su abreviación *E. coli*.

SIGLAS

ATP: (ing).

Adenosine triphosphate: trifosfato de adenosina

C-P:

Carbono-fósforo.

Pi: (ing).

Fósforo inorgánico

UV:

Ultravioleta

sp. (latin)

Especies

FOD:

Fósforo orgánico disuelto

ADN:

Ácido desoxiribonucleico

ARN:

Ácido Ribonucleico

NETS:

Nitrógeno, EDTA, TRIS, SDS

BMB: (ing)

Bacto Marine Broth: Caldo Bacto Marino

YTSS: (ing)

Yeast, tryptone, sea salts: Extracto de levadura, triptona y sales de mar

MMM:

Medio mineral marino

PCR: (ing).

Polimerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa.

NaCl:

Cloruro de Sodio

PHA: (ing).

Polyhydroxyalkanoate: polihidroxiálcanoato

PHB: (ing).

Polyhydroxybutyrate: polihidroxi butirato

C:N:

Relación Carbono y Nitrógeno en una solución

K₂HPO₄:

Fosfato de potasio dibásico

NaH₂PO₄:

Fosfato monosódico

NCBI: (ing).

National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

UNIDADES

nM:

Nanomolar

μM:

Micromolar

mM:

Milimolar

kb:

Kilobase

ml:

Mililitro

rpm:

Revoluciones por minuto

μl:

Microlitros

°C:
Centígrado

M:
Molar

nm:
Nanómetros

pb:
Pares de base

%:
Por ciento

g:
Gramos

pH:
Potencial de hidrógeno

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funcionamiento del sistema genético de transducción de dos componentes regido por la concentración de fósforo inorgánico en el ambiente.....	13
Figura 2. Operón <i>phn</i> de la bacteria <i>E. coli</i> K12 conformado por 14 genes transcritos en tándem.....	13
Figura 3. a) características macroscópicas de las colonias obtenidas de cultivos de <i>R. nubinhibens</i> ISM en medio YTSS. b) Micrografía en campo claro de la bacteria <i>R. nubinhibens</i> ISM (magnificación 100x).....	22
Figura 4. Visualización de la calidad del ADN genómico extraído a partir de cultivos de la bacteria <i>R. nubinhibens</i> ISM.....	23
Figura 5. Visualización de la calidad del amplicón del gen 16S de la bacteria <i>R. nubinhibens</i> ISM.....	23
Figura 6. Curvas de crecimiento de la bacteria <i>R. nubinhibens</i> ISM en medios naturales.....	25
Figura 7. Curvas de crecimiento de la bacteria <i>R. nubinhibens</i> ISM en el medio mínimo marino (MMM).....	26
Figura 8. Curvas de crecimiento de la bacteria <i>R. nubinhibens</i> ISM en el medio mínimo marino (MMM) suplementado con (●) metilfosfonato 1mM, (●) fosfato de potasio 1mM, y (●) sin fuente de fósforo.....	27
Figura 9. Micrografías de fluorescencia para la prueba de producción de PHA en cultivos de la bacteria <i>R. nubinhibens</i> ISM crecida en medio mínimo marino (MMM) suplementado (●) sin fuente de fósforo, (●) con fosfato de potasio 1mM, y (●) con metilfosfonato 1mM. (Magnificación 100x).....	29
Figura 10. Micrografías en campo claro de la bacteria <i>R. nubinhibens</i> ISM crecida en medio mínimo marino (MMM) suplementado (●) sin fuente de fósforo, (●) con fosfato de potasio 1mM, y (●) con metilfosfonato 1mM. (Magnificación 100x).....	30
Figura 11. Monitoreo de la concentración del ion fosfato durante el cultivo de la bacteria <i>R. nubinhibens</i> ISM en el medio MMM sin suplemento de fósforo.....	30
Figura 12. Monitoreo de la concentración del ion fosfato durante el cultivo de la bacteria <i>R. nubinhibens</i> ISM en el medio MMM suplemento con metilfosfonato.....	31
Figura 13. Cromatogramas de la detección de metano en diferentes condiciones de cultivo a) <i>R. nubinhibens</i> ISM + metilfosfonato, b) <i>R. nubinhibens</i> ISM + metilfosfonato + 0.1 mM de Fosfato de potasio a las 18 horas de crecimiento, c) <i>R. nubinhibens</i> ISM sin fuente de fósforo, d) <i>R. nubinhibens</i> ISM + K ₂ HPO ₄ , e) metilfosfonato sin inocular.....	32

RESUMEN

Elida Estefanía Lee Bazaldúa

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de Graduación: Junio, 2019

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Título del estudio: Vía para la resolución de la paradoja del metano oceánico: producción aeróbica constitutiva de metano por la actividad de la enzima C-P liasa desregulada de la bacteria marina *Roseovarius nubinhibens*.

Área de estudio: Microbiología Ambiental Aplicada

Número de páginas: 52

Propósito y método de estudio:

"La paradoja del metano oceánico" describe el hecho de que a lo largo de la superficie del océano existen altas concentraciones de metano con respecto a la atmósfera, sin embargo, las condiciones ambientales que existen en ese ecosistema inhiben la metanogénesis tradicional, por lo que el origen de dicho metano permanece como un misterio hasta nuestros días.

Estudios recientes han demostrado que la bacteria marina *Roseovarius nubinhibens* ISM es capaz de metabolizar el metilfosfonato como única fuente de fósforo bajo condiciones aeróbicas. Ésto debido a que el sistema de regulación del operón pho presente en esta bacteria está controlado por el regulador lysR, lo cual le brinda la característica de poder expresarse independientemente de las concentraciones ambientales de fósforo.

El estudio de la expresión constitutiva de la enzima C-P liasa en *R. nubinhibens* ISM y la cuantificación de metano producida por el uso del metilfosfonato como única fuente de fósforo nos abre un panorama para entender de manera más exacta los comportamientos de ésta bacteria en el océano y poder plantear una resolución a la "paradoja del metano oceánico".

Conclusiones y contribuciones:

La presencia del regulador *lysR* en el operón de la C-P liasa en *R. nubinhibens* ISM podría ser responsable de su capacidad de expresar la enzima en altas concentraciones de fósforo permitiéndole subsistir en un nicho ecológico tan hostil como el océano.

La presencia de metano en la fase vapor del bioensayo suplementado con metilfosfonato y fosfato de potasio demuestra que la bacteria *R. nubinhibens* es capaz de biotransformar el metilfosfonato a metano, de manera independiente a los niveles exógenos del medio. Con esto, se puede sugerir que esta bacteria propia de la superficie del océano, podría ser responsable de la generación de metano *in situ* que da origen a la paradoja del metano oceánico.

Entender el sistema de regulación de la enzima C-P liasa en *R. nubinhibens* ISM ayudará a implementar un sistema de degradación de contaminantes organofosforados como lo es glifosato en sistemas marinos.

1. INTRODUCCIÓN

El océano es un ecosistema único en el planeta, ya que cuenta con una amplia variedad de factores que afectan su biodiversidad. Ejemplo de ello es la baja disponibilidad de macronutrientes, tales como el oxígeno, nitrógeno, fósforo y hierro, quienes juegan un papel fundamental en la distribución de la vida a lo largo de la columna de agua. Esto se ve reflejado a nivel microscópico, donde se sabe que existe una amplia variedad de microorganismos que van cambiando conforme a la profundidad del océano. Se sabe que las clases predominantes en este hábitat son las alfa-, gama- y delta-proteobacterias, así como las bacteroidetes (Walsh *et al.* 2011).

La competencia por la adquisición de nutrientes vitales, así como la supervivencia misma en un medio ambiente tan hostil como lo es el océano ha llevado a los microorganismos a una rápida adaptación y así garantizar la obtención de los recursos necesarios para su proliferación. Es de esta manera que el estudio del metabolismo microbiano del fósforo en el océano es único por presentar una fuerte limitación de este macronutriente en el ambiente.

Es importante destacar que el fósforo debe su importancia para la vida al estar involucrado en biomoléculas esenciales tales como los ácidos nucleicos, el ATP y fosfolípidos. De esta manera, los microorganismos tienden a adquirir este elemento directamente del medio ambiente, principalmente en la forma de fosfato inorgánico. No obstante, se ha demostrado que éste es rápidamente asimilado, llegando a ser un elemento limitante crítico para los microorganismos que habitan ahí. Por otra parte, los microorganismos son capaces de obtener el fósforo a partir de diferentes compuestos orgánicos disueltos, los cuales provienen de sistemas biológicos, ya que los esteres de fosfatos se encuentran involucrados en numerosas rutas metabólicas (Martinez *et al.* 2010; Villarreal-Chiu *et al.* 2012; Dyhrman *et al.* 2007). Es entonces que el estudio de la adquisición de fuentes orgánicas e inorgánicas del fósforo dan explicación al comportamiento de las comunidades microbianas en el medio ambiente marino (Björkman y Karl 2003).

A pesar de lo anterior, estudios realizados por espectroscopia de resonancia magnética nuclear han demostrado que cerca de un 25% de la materia orgánica disuelta en el mar está compuesta por una familia de compuestos organofosforados denominados fosfonatos (Benitez-Nelson 2000). Esta familia de compuestos, caracterizados por el enlace C-P, ha sido catalogada históricamente como inerte o no biodisponible para la vida marina. Sin embargo, se sabe que estos compuestos orgánicos son capaces de actuar como fuente de fósforo para microorganismos presentes en el suelo (Villarreal-Chiu *et al.* 2012). Es por esto que en años recientes se ha fomentado la hipótesis de que los fosfonatos pueden llegar a ser actores principales en la dinámica de las poblaciones microbianas marinas (Karl *et al.*, 2008).

El compuesto más sencillo de la familia de los fosfonatos es el metilfosfonato, el cual está constituido por un grupo metilo unido covalentemente al átomo de fósforo de un grupo fosfato. Al ser degradado por acción de la enzima C-P liasa, el metilfosfonato genera como productos fosfato inorgánico, el cual es rápidamente metabolizado por el hospedero, y metano, el cual es liberado al ambiente (Dyhrman *et al.* 2006). Sin embargo, se sabe que esta enzima se encuentra fuertemente regulada por la concentración de fosfato inorgánico (Pi) en el ambiente, siendo activada solamente en su ausencia (Villarreal-Chiu *et al.* 2012). Sin embargo, estudios bioinformáticos recientes sugirieron que la enzima C-P liasa presente en la bacteria marina *Roseovarius nubinhibens* podría no estar regulada bajo el mismo sistema, por lo que ésta característica permitiría que *R. nubinhibens* pudiera disponer del metilfosfonato de manera directa, ajeno a las concentraciones de Pi en el ambiente (Villarreal-Chiu 2011). De demostrarse esta actividad, se daría una solución práctica y real a un fenómeno oceanográfico que ha intrigado a los investigadores desde hace mucho tiempo, el llamado “la paradoja del metano oceánico”.

"La paradoja del metano oceánico" consiste en la súper saturación de metano en la superficie del océano en comparación con los niveles menores presentes en la atmosfera. (Lamontagne *et al.* 1971; Lamontagne *et al.* 1973; Lamontagne *et al.* 1974). Hasta el día de hoy, la ciencia no ha podido confirmar el origen del metano que sobresatura las aguas superficiales del océano, ya que la metanogénesis se produce estrictamente bajo condiciones de

anaerobiosis y las columnas de agua están bien oxigenadas. Entonces, ¿por qué hay una alta saturación de metano en el océano? (Metcalf et al. 2012).

2. ANTECEDENTES

Desde los inicios de la oceanografía moderna se ha observado que existe una alta concentración de metano en la superficie del océano, la cual puede variar entre un 105 a 138% de saturación con respecto a la concentración presente en la atmósfera. A este fenómeno se le ha conocido desde entonces como “la paradoja del metano oceánico” (Lamontagne *et al.*, 1971, 1973). Esta paradoja presenta una serie de preguntas que abarcan aspectos químicos, biológicos y geológicos, ya que según la biogeoquímica tradicional, el metano solo puede ser generado en sistemas anaeróbicos. Sin embargo, el océano presenta altas concentraciones de oxígeno disuelto (Tahuer 1998). A raíz de esto, se han postulado diferentes propuestas que buscan dilucidar la respuesta a este fenómeno físico poco convencional de la naturaleza. Un ejemplo de ello son los estudios llevados a cabo por Reeburgh y colaboradores en el 2007, quienes determinaron que el metano es producido *in-situ* en la superficie del océano, donde el metano permanece a una concentración constante de alrededor de 5 nM a lo largo del año (Reeburgh 2007). Otros estudios sugieren que la síntesis del metano puede provenir de la descomposición de materia orgánica del fondo del océano (Karl and Tilbrook 1994), o de la degradación de metil-ésteres por radiación UV, inclusive del transporte de metano por corrientes marinas desde sedimentos marinos o aguas anóxicas donde se puede llevar a cabo la metanogénesis (McGrath *et al.*, 2013; Wadham *et al.*, 2012). Sin embargo, ninguno de estos estudios cumple con las condiciones ambientales para demostrar el origen de la alta concentración de metano que se presenta en la superficie del océano.

No obstante, gracias a estudios comparativos con ecosistemas terrestres, se ha propuesto que la degradación por microorganismos de la superficie del océano de un compuesto fosfónico denominado metilfosfonato, podría generar las cantidades de metano responsables de la paradoja (Karl *et al.*, 2008). Esta propuesta está basada en la actividad de una enzima denominada C-P liasa, la

cual, como su nombre lo indica, rompe el enlace covalente entre los átomos de carbono y fósforo de la molécula fosfónica.

Esta actividad fue descrita por primera vez en la bacteria *Escherichia coli* K12, la cual fue capaz de utilizar el metilfosfonato como única fuente de fósforo, liberando metano como resultado de la desfosforilación (Wackett *et al.*, 1987). A partir de este descubrimiento, se identificaron una amplia gama de microorganismos terrestres capaces de llevar a cabo este mismo proceso. Entre estos microorganismos se encuentran *Arthrobacter* sp. GLP-1, *Rhizobium* sp., *Pseudomonas testosteroni* DSM 1622, *Pseudomonas* sp. 7NSK2, *Escherichia coli* Crooke DSM 1576 (Yakovleva *et al.*, 1998), *Pseudomonas* sp. PG 2982, *Alcaligenes eutrophus*, *Rhodobacter capsulatus* ATCC 23782 (Schowanek and Verstraete 1990), *Klebsiella aerogenes* (Imazu *et al.*, 1998), *Rhizobium meliloti* (Parker *et al.*, 1999), *Pseudomonas stutzeri* (White and Metcalf 2004) y *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Vera *et al.*, 2008).

No fue sino hasta el año 2008, cuando Karl y colaboradores emplearon este conocimiento para llevar a cabo experimentos en una matriz de agua colectada de la superficie del mar de Hawái, suplementada con metilfosfonato. Después de 48 horas de incubación se detectó el crecimiento de microorganismos en la muestra, así como una producción significativa de metano. A pesar del éxito obtenido, los autores no pudieron determinar con certeza los microorganismos implicados en la producción de este gas, además de que enfatizaron la necesidad de suplementar el metilfosfonato a la muestra (Karl *et al.*, 2008). Experimentos similares llevados a cabo posteriormente demostraron que al inocular matrices de agua marina suplementadas con metilfosfonato, las cianobacterias oceánicas *Trichodesmium erythraeum* IMS 101 (Dyhrman *et al.*, 2006), *Synechococcus* sp. (Adams *et al.*, 2008), *Trichodesmium* (Del Valle and Karl 2014) y *Pelagibacterales* sp. HTCC721 fueron capaces de utilizar el metilfosfonato para producir metano. Mediante técnicas de biología molecular, los autores también fueron capaces de vincular esta actividad a la acción de la C-P liasa (Carini *et al.*, 2014). No obstante, todas las cianobacterias presentaron la importante restricción de poder producir metano solo bajo condiciones controladas de laboratorio y cuando las concentraciones de fósforo eran menores a 4 μM . Al emplear muestras de agua oceánica real, o

suplementadas con concentraciones de fósforo superiores a dicha concentración, todas las cianobacterias fueron incapaces de producir metano, sugiriendo que el proceso llevado a cabo por la enzima C-P liasa era incompatible con las condiciones reales encontradas en el océano. A pesar de no haber logrado la resolución de la paradoja, estos experimentos demostraron que el metilfosfonato podría jugar un papel importante en este fenómeno físico, ya que su transformación a metano por la actividad de la enzima C-P liasa es llevada a cabo bajo condiciones aeróbicas, contrario a la metanogénesis.

A pesar de su aparente importancia en la resolución de la paradoja, la presencia de metilfosfonato en aguas oceánicas no fue descubierta hasta el año 2012 por Metcalf y colaboradores. Mediante el estudio de la bacteria marina *Nitrosopumilus maritimus*, éstos investigadores lograron identificar la presencia de 2-hidroxietilfosfonato en muestras oceánicas (Metcalf *et al.*, 2012). Este conocido intermediario de la ruta biosintética del metilfosfonato por bacterias de suelo (Shao *et al.*, 2008) ayudó a estos investigadores a aislar la enzima metilfosfonato sintasa (MPnS), la cual es responsable de sintetizar metilfosfonato a partir del 2-hidroxietilfosfonato. Trabajos realizados por Peck y colaboradores en el año 2015, ayudaron a dilucidar la ruta de biosíntesis de metilfosfonato en su totalidad (Peck *et al.*, 2015).

A través de estos resultados, se logró vincular al metilfosfonato con las moléculas de fósforo orgánico disuelto (FOD) que se encuentran en el océano. Estas llegan a estar compuestas por ésteres de fosfato y por otros fosfonatos de mayor peso molecular (75% y 25%, respectivamente) (Clark *et al.* 1999; Benitez-Nelson *et al.* 2007). Se sabe que el FOD suele provenir del material biológico en descomposición, lo cual genera elevados niveles de FOD en el océano en comparación con el Pi. Esto sugiere que el FOD podría ser una fuente muy importante de fósforo para el metabolismo de los microorganismos, llegando a ser un componente clave para la composición y dinámica de la comunidad microbiana marina (Martinez *et al.*, 2010; Villarreal-Chiu *et al.*, 2012). Esta hipótesis se ha fortalecido gracias a estudios de metagenómica *in-situ* (Villarreal-Chiu *et al.*, 2012), donde se reporta que el 10% de las secuencias en bacterias presentes en el océano codifican genes involucrados en rutas metabólicas de la biosíntesis de fosfonatos, mientras que un 40%

codifican para una o más de las rutas metabólicas involucradas en el catabolismo de fosfonatos.

Cabe destacar que el proceso metabólico para la adquisición de fósforo por las células microbianas está regido por un gran número de factores, de entre los cuales destaca la concentración extracelular de este elemento químico. De esta manera, se sabe que cuando existe una concentración superior a los 4μM de fósforo en el medio ambiente, la célula, estando en un estado no estresado, incorpora al fósforo mediante el sistema *Pit* (phosphate inorganic transport). Sin embargo, estando frente a una concentración menor, la célula transcribe el sistema de transporte específico de fosfato (*Pst*, por sus siglas en inglés), además de expresar una serie de genes llamados genes inducibles por inanición de fosfato (*Psi*, por sus siglas en inglés).

Los genes *Psi* codifican para proteínas involucradas en el transporte de fósforo, tanto en su forma de Pi, como de otras moléculas orgánicas que lo contengan, como polifosfatos y fosfonatos. Estos genes *Psi* son parte de un componente genético denominado regulón Pho, el cual hace referencia a un sistema de regulación universal presente en los microorganismos. Este sistema está compuesto por un *set* de genes inducidos bajo una misma señal fisiológica (en este caso, inducidos por la deficiencia de fósforo en el medio) y controlada por un mismo sistema genético de transducción de dos componentes (Vershinina and Znamenskaya 2002; Santos-Beneit 2015), el cual consiste de las proteínas PhoB-PhoR en bacterias Gram negativas y PhoP-PhoR en bacterias Gram positivas. Este sistema responde a las concentraciones extracelulares de Pi (Monds *et al.*, 2006; White and Metcalf 2007), de tal manera que PhoR es activada cuando las concentraciones de Pi en el medio son menores a 4μM, y a su vez, regula mediante fosforilación o desfosforilación al regulador transcripcional PhoB /PhoP como puede observarse en la Figura 1.

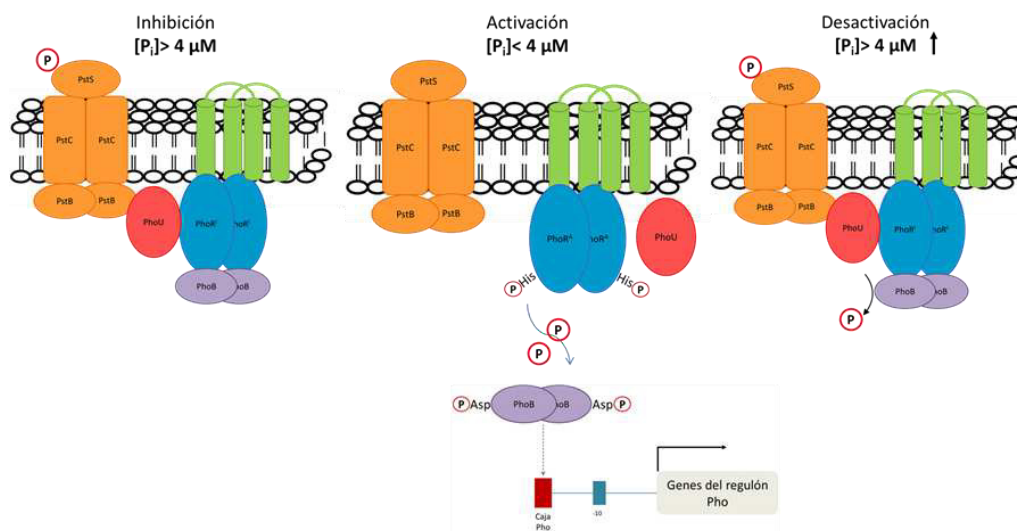


Figura 1. Funcionamiento del sistema genético de transducción de dos componentes regido por la concentración de fósforo inorgánico en el ambiente (Lamarche *et al.*, 2008; Hsieh and Wanner 2010).

En la bacteria *E. coli*, el sistema *Psi* consta de 137 genes, de los cuales 118 son inducidos y 19 son suprimidos por las condiciones de deficiencia de fósforo en el medio. Todos estos han sido vinculados a diferentes funciones en la célula que le permitan obtener fósforo del medio ambiente para poder continuar sus funciones metabólicas de manera normal (Vershinina and Znamenskaya 2002; Santos-Beneit 2015).

Dentro de los genes del sistema *Psi* se encuentran aquellos que están involucrados en el catabolismo de compuestos fosfonatos, incluyendo los 14 genes que codifican para la C-P liasa (Kamat *et al.*, 2011). Estos genes están organizados en tándem en un operón policistrónico de 10.9 kb denominado operón *phn* (Figura 2). Esta enzima debe su importancia a que es capaz de degradar una amplia variedad de fosfonatos, los cuales funge a su vez como fuente de fósforo para la célula (Metcalf and Wanner 1993; McGrath *et al.*, 1997).

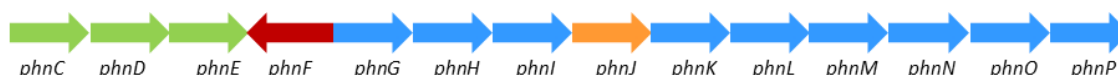


Figura 2. Operón *phn* de la bacteria *E. coli* K12 conformado por 14 genes transcritos en tándem.

Al ser una enzima de 14 subunidades, se ha descubierto que los fosfonatos son transformados por acción de algunos componentes (proteínas PhnIJKLMNO) en una serie de intermediarios metabólicos que dan lugar a la incisión del enlace C-P (Hove-Jensen *et al.*, 2010), mientras que otros están involucrados en la transportación de los fosfonatos a través de la membrana (PhnCDE) (Hove-Jensen *et al.*, 2010, 2011)

A pesar de que la expresión de la enzima C-P liasa está controlada por el sistema genético de transducción de dos componentes antes mencionado, se sabe que el componente PhnF codifica para una proteína reguladora adicional, la cual pertenece a la familia GntR de reguladores transcripcionales (Reizer *et al.*, 1991). El estudio de esta proteína en *Mycobacterium smegmatis* (Gebhard *et al.*, 2014) y *E. coli* (Gorelik *et al.*, 2006) han demostrado que participa en la regulación de la transcripción del operón *phn*, fungiendo como un represor de la expresión del operón cuando la célula se encuentra frente a concentraciones de fosfato superiores a 4µM (Reizer *et al.*, 1991; Gorelik *et al.*, 2006; Jain 2015). Esta es la causa por la que en los experimentos descritos anteriormente, las cianobacterias oceánicas *Trichodesmium erythraeum* IMS 101 (Dyhrman *et al.*, 2006), *Synechococcus* sp. (Adams *et al.*, 2008), *Trichodesmium* (Del Valle and Karl 2014) y *Pelagibacteriales* sp. HTCC721 fueron capaces de utilizar el metilfosfonato para producir metano solo bajo condiciones controladas de laboratorio y a concentraciones de fósforo menores a 4 µM.

No obstante, estudios bioinformáticos han reportado que la bacteria marina *Roseovarius nubinhibens* posee un regulador adicional en la región *downstream* del operón *phn* llamado *lysR*. Este tipo de regulador posee la particularidad de ser sensible a la presencia de co-inductores, lo cual permite generar un bucle de retroalimentación en el que un producto o intermediario de una ruta metabólica actúa como co-inductor para la activación o represión de su transcripción. Esto supondría que el operón *phn* de esta bacteria podría sobrepasar la estricta regulación generada por la proteína PhnF y el sistema genético de transducción de dos componentes, siendo capaz de expresar la enzima C-P liasa en condiciones no convencionales (Villarreal-Chiu, 2011). Esto representa una característica única y convierte a la bacteria *R. nubinhibens* en un organismo modelo para el estudio de la degradación

aeróbica de metilfosfonato, libre de la regulación ejercida por la concentración de fósforo exógeno.

Debido a esta característica, el presente trabajo busca mediante el empleo de este organismo modelo, dar solución a la paradoja del metano oceánico, vinculando la producción de metano *in-situ* con el metabolismo de metilfosfonato por acción del metabolismo de la C-P liasa presente en la bacteria marina *R. nubinhibens*.

3. APORTACIÓN CIENTÍFICA

Contribuir a la resolución de la paradoja del metano oceánico mediante el estudio del microorganismo modelo *R. nubinhibens* ISM, cuyo regulador génico *lysR* podría contribuir a sobrepasar la estricta regulación generada por la proteína PhnF y el sistema genético de transducción de dos componentes, siendo capaz de expresar la enzima C-P liasa en condiciones no convencionales a fin de demostrar la producción de metano a partir de la degradación de metilfosfonato bajo condiciones aeróbicas e independientes de la concentración de fósforo en el medio.

4. HIPÓTESIS

La enzima C-P liasa de la bacteria marina *R. nubinhibens* ISM es capaz de producir metano de manera constitutiva empleando el metilfosfonato como fuente de fósforo bajo condiciones aeróbicas.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de metano bajo condiciones aeróbicas a partir del uso de metilfosfonato como fuente de fósforo por la enzima C-P liasa presente en la bacteria marina *R. nubinhibens* ISM.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Reactivar, identificar y caracterizar a la bacteria *R. nubinhibens* ISM.
2. Demostrar la capacidad de *R. nubinhibens* ISM para utilizar metilfosfonato como única fuente de fósforo.
3. Cuantificar el metano producto de la degradación de metilfosfonato por la bacteria *R. nubinhibens* ISM.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 LOCALIZACIÓN

Las actividades realizadas en este proyecto de investigación se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología I del Centro de Laboratorios Especializados de la Facultad de Ciencias Químicas y en la Unidad de Manipulación Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, ambas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

7.2 EQUIPO

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| • Material de vidrio (Pyrex/Kimax) | (Thermo Spectronic/400114) |
| • Balanza analítica (AND/HR-200) | • Microscopio de fluorescencia |
| • Incubadora con agitación | (Leica/DM3000) |
| (Barnstead International/Shka-4000) | • Microcentrífuga |
| • Autoclave automática | (Eppendorf/5415D) |
| (Tuttnauer/2540M) | • Incubadora con agitación |
| • Microscopio binocular | (SHEL-LAB/1575) |
| (Carl Zeiss/Standard 25) | • Termociclador (Thecne/3prime) |
| • Espectrofotómetro UV/VIS | • Cromatógrafo de gases |
| | (Thermo Scientific/Trace 1310) |

7.3 REACTIVOS

- Sales de mar (Sigma-Aldrich)
- Triptona (BD Bioxon)
- Extracto de levadura (BD Bioxon)
- Cloruro de potasio (DEQ)
- Cloruro de calcio (DEQ)
- Sulfato de magnesio Heptahidratado (DEQ)
- Peptona (Sigma-Aldrich)
- Tris base (J. T. Baker)
- Acetato de sodio (DEQ)
- Cloruro de magnesio (DEQ)
- Cloruro de sodio (DEQ)
- Citrato de amonio y hierro (III) (Sigma-Aldrich)
- Fosfato de potasio monobásico (DEQ)

7.4 MÉTODOS

7.4.1 Reactivación de la cepa comercial *R. nubinhibens* ISM en medio YTSS

La bacteria marina *Roseovarius nubinhibens* ISM fué adquirida del Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Para su reactivación, se utilizó la metodología propuesta por el proveedor, el cual consistió en la rehidratación de la cepa empleando el medio YTSS descrito por (González *et al.* 2003) por espacio de 2 horas. Seguido a esto, se prosiguió a propagarla empleando un volumen de 50 mL del mismo medio en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, el cual se incubó a 30 °C a una agitación constante de 150 rpm por 5 días.

Una muestra del cultivo fue crio-preservada en microtubos de 1.5 mL a los cuales se les adicionó 600 µL de glicerina estéril al 50 % y 400 µL del medio de propagación. Las muestras fueron congeladas a -21 °C hasta su posterior uso.

7.4.2 Confirmación de la identidad de la cepa comercial *R. nubinhibens* ISM mediante la secuenciación del gen 16S

A fin de confirmar la identidad de la de la bacteria comercial adquirida, se llevó a cabo la secuenciación del gen 16S ribosomal. La extracción del ADN genómico se realizó mediante el método de fenol:cloroformo, el cual consistió en lo siguiente. Se concentró un cultivo de *R. nubinhibens* ISM en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Después de descartar el sobrenadante, se agregaron 200 µL de buffer NETS, para ser agitado en vortex e incubar la muestra por 5 minutos en un termomixer a 90 °C. La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, al cual se le agregaron 200 µL de fenol:cloroformo (25:24). La mezcla fue mezclada por vortex hasta conseguir una consistencia homogénea de color blanco. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos y se tomaron 200 µL de la fase acuosa para ser transferidos a un tubo nuevo. A este se le agregó 0.1 volúmenes de acetato de amonio al 7.5 M y 2 volúmenes de etanol al 100% para dejarse precipitando toda la noche a -21 °C.

Al día siguiente, la muestra fue centrifugada a 14,000 rpm por 15 minutos, descartándose el sobrenadante y lavando la pastilla con 300 µL de etanol al 70%. La mezcla se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 5 minutos, retirándose el sobrenadante con ayuda de una puntilla y se dejó secar la pastilla por 5 minutos a temperatura ambiente. La pastilla fue resuspendida en 20 µL de agua mQ estéril suplementada con RNAsa (100 µL/mL) y se incubó por 5 minutos a 37 °C. Para observar la integridad del ADN, se corrió un gel de electroforesis a una concentración de 0.7% de agarosa.

La amplificación del gen se realizó empleando la enzima MyTaq DNA polimerasa de la marca Bioline y los oligonucleótidos universales 27F y 1492R para el gen 16S. La temperatura de alineamiento fue de 54.5°C por 30 ciclos. Por último, se corrió un gel de electroforesis al 1.5% de agarosa utilizando GelRed como agente revelador. El amplicón resultante fue enviado a la empresa Macrogen en Maryland, Estados Unidos para su secuenciación.

7.4.3 Caracterizar el crecimiento de *R. nubinhibens* ISM en medios naturales mediante un estudio cinético

A fin de conocer el crecimiento y desarrollo de la bacteria *R. nubinhibens* ISM, se realizaron estudios cinéticos en los medios naturales YTSS y BMB. Para esto, se prepararon 50 mL de cada medio en matraces Erlenmeyer de 250 mL e inocularon con la cepa a una densidad óptica inicial de 0.05. Las muestras fueron incubadas por triplicado a 30 °C con un agitación de 150 rpm y su crecimiento fue monitoreado mediante la medición de la densidad óptica cada 6 horas en un espectrofotómetro de UV-Visible Cary50 marca Varian a una longitud de onda de 620 nm.

7.4.4 Caracterizar el crecimiento de *R. nubinhibens* ISM en medio mínimo mediante un estudio cinético

A fin de evaluar si la bacteria *R. nubinhibens* ISM podía sobrevivir y desarrollarse en un medio que permitiera realizar los ensayos de metabolización del metilfosfonato, se realizaron estudios cinéticos en el medio mínimo mineral (MMM). Para esto se prepararon 50 mL de MMM en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se inocularon a una densidad óptica inicial de 0.05. Es importante destacar que los inóculos fueron prelavados con el medio MMM para eliminar los residuos de medio YTSS donde se preparó el inóculo, ya que este contiene grandes cantidades de fosfato que podrían interferir con el ensayo. Las muestras fueron incubadas por triplicado a 30 °C y agitadas a 150 rpm. El crecimiento del cultivo fue monitoreado cada 6 horas por espectrofotometría de UV-Visible a una longitud de onda de 620 nm.

7.4.5 Demostrar la capacidad de *R. nubinhibens* ISM para utilizar metilfosfonato como única fuente de fósforo

A fin de demostrar que la bacteria *R. nubinhibens* ISM podía utilizar metilfosfonato como única fuente de fósforo, se realizaron ensayos cinéticos en 50 mL del medio MMM suplementados con una relación de carbono, nitrógeno y metilfosfonato de 100:4:1. Como control experimental positivo, se suministró fosfato de potasio como fuente de fósforo en lugar de metilfosfonato y como control experimental negativo, se omitió la adición de fósforo al medio.

Los ensayos experimentales fueron inoculados a una densidad óptica inicial de 0.05, teniendo cuidado de lavar previamente el inóculo con el medio MMM para

eliminar los residuos de medio YTSS donde preparó el inóculo. Las muestras fueron incubadas por triplicado a 30 °C y agitadas a 150 rpm. El crecimiento del cultivo fue monitoreado cada 6 horas por espectrofotometría de UV-Visible a una longitud de onda de 620 nm. Además, se guardaron en congelación, 1 mL de cada punto de muestreo para posteriores análisis.

Durante cada muestreo, se realizaron pruebas de estrés nutricional empleando la técnica de tinción de Azul Nilo descrita por (Ostle and Holt 1982), la cual describe la formación de gránulos de polihidroxialcanoatos como respuesta a la ausencia de fósforo, los cuales pueden ser visualizados por microscopía de fluorescencia. Para llevar a cabo esta tinción, se procedió a centrifugar 1 mL de muestra por 5 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante es descartado y al pellet de bacterias se le agregaron 30 µL del colorante Azul Nilo. La mezcla se dejó en baño de agua a 55 °C por 10 minutos. Posteriormente, el pellet fue lavado con agua y centrifugado para ser resuspendido en 10 µL de agua destilada. De esta manera, la muestra fue depositada en un portaobjeto limpio y fue visualizada en un microscopio de fluorescencia marca Leica modelo DM3000 con el filtro TXR. Es importante no utilizar aceite de inmersión directamente en el frotis debido a que el colorante es liposoluble y tiende a solubilizarse en el aceite mineral.

Adicionalmente, se monitoreó durante cada muestreo la concentración del ion fosfato en el medio de cultivo. Esto con la finalidad de identificar si la bacteria era capaz de librar fosfato al medio como resultado de la biotransformación del metilfosfonato. Esto se llevó a cabo empleando el reactivo Biomol® Green (Enzo 2017), el cual genera un complejo coloreado con el ion fosfato que puede ser cuantificado por espectrofotometría de UV-Vis. La técnica consiste en incubar 100 µL de la muestra con 1 mL del reactivo y dejándose reaccionar por 20 minutos. El producto de la reacción se cuantifica a una longitud de onda de 620 nm.

7.4.6 Cuantificación de metano producto de la degradación de metilfosfonato por la bacteria *R. nubinhibens* ISM

Una vez demostrado que la bacteria *R. nubinhibens* ISM podía utilizar metilfosfonato como única fuente de fósforo, se procedió a cuantificar el metano generado como producto de la metabolización del metilfosfonato suplementado. Para esto se realizaron ensayos experimentales en 5 mL del medio MMM suplementados con una relación de carbono, nitrógeno y metilfosfonato de 100:4:1, en frascos serológicos sellados de 15 mL. Como control experimental positivo, se suministró fosfato de potasio como fuente de fósforo en lugar de metilfosfonato y como control experimental negativo, se omitió la adición de fósforo al medio.

Los ensayos experimentales fueron inoculados a una densidad óptica inicial de 0.05, teniendo cuidado de lavar previamente el inóculo con el medio MMM para eliminar los residuos de medio YTSS donde preparó el inóculo. Las muestras fueron incubadas por triplicado a 30 °C y agitadas a 150 rpm. Se tomaron muestras de 100 µL de la fase gaseosa a las 24 horas de experimentación, las cuales fueron inyectadas a un cromatógrafo de gases marca Thermo Scientific acoplado a un detector de ionización de flama para cuantificar la concentración de metano. El análisis cromatográfico se corrió empleando una columna marca Trace Gold, con las siguientes condiciones de separación: temperatura de inyector de 150 °C, temperatura del horno 100 °C y temperatura del detector a 100 °C. Como gas acarreador se empleó helio con un tiempo de retención de 5 minutos.

8. Resultados y Discusión

8.1 Reactivación de la cepa comercial *R. nubinhibens* ISM en medio YTSS

La cepa comercial de *R. nubinhibens* ISM fue reactivada en el medio natural YTSS, de la cual se obtuvieron colonias circulares regulares, con margen color crema y centro color naranja-marrón (Figura 3a). Estas características físicas fueron reportadas también por González y colaboradores en el 2003, quienes aislaron la bacteria por primera vez a partir de muestras del océano atlántico (González *et al.* 2003). Bajo el microscopio, la cepa presentó una morfología de bacilo Gram negativa de tamaño pequeño, característico de la bacteria (Figura 3b)

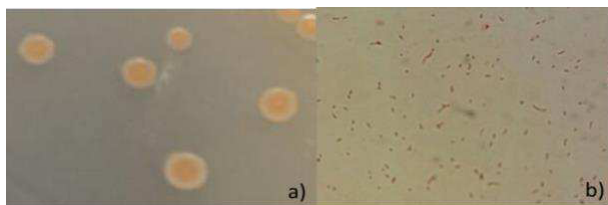


Figura 3. a) características macroscópicas de las colonias obtenidas de cultivos de *R. nubinhibens* ISM en medio YTSS. b) Micrografía en campo claro de la bacteria *R. nubinhibens* ISM (magnificación 100x).

8.2 Confirmación de la identidad de la cepa comercial *R. nubinhibens* ISM mediante la secuenciación del gen 16S

A fin de confirmar la identidad de la cepa comercial adquirida, se llevó a cabo una prueba de identificación molecular. Dado que la región intergénica del gen 16S del ARN ribosomal ha sido considerada históricamente como un buen marcador molecular para la identificación de microorganismos debido a la alta conservación de su secuencia nucleotídica a lo largo del tiempo (Osborne *et al.* 2005), llevamos a cabo una amplificación del gen 16S de la bacteria marina empleando los oligonucleótidos universales 27F y 1492R. Para esto, se extrajo inicialmente el ADN genómico, el cual, como puede observarse en la Figura 4, se encontraba en óptimas condiciones para ser empleado en los ensayos de PCR ya que no se presentaron rastros de degradación a lo largo del carril. Las dos bandas inferiores son comúnmente atribuidas a las dos subunidades del ARN ribosomal (Hanna and Xiao 2006).

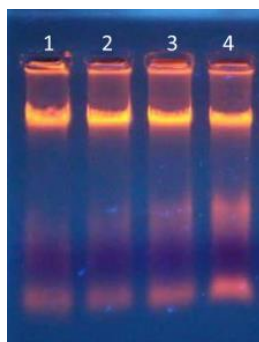


Figura 4. Visualización de la calidad del ADN genómico extraído a partir de cultivos de la *bacteria R. nubinhibens* ISM.

El amplicón del gen 16S obtenido de la PCR con los oligonucleótidos universales 27F y 1492R presentó el tamaño de banda esperado, el cual consistió en aproximadamente 1500 pb (Figura 5). Además de esto, el amplicón no presentó degradación o productos de PCR no deseados que pudieran contaminar la muestra a secuenciar.

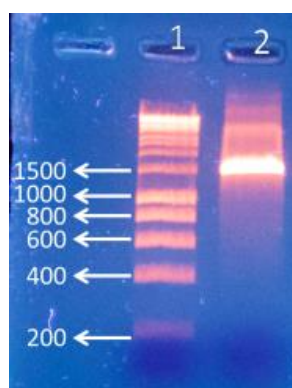


Figura 5. Visualización de la calidad del amplicón del gen 16S de la *bacteria R. nubinhibens* ISM.

La secuenciación del amplicón reportó una secuencia nucleotídica de 1418 pb, la cual, al ser sometida a un análisis de homología por Blastn (llevada a cabo en el portal del National Center for Biotechnology Information el día 20 de Marzo 2019), mostró una identidad del 99.91% con la secuencia nucleotídica reportada para *Roseovarius nubinhibens* ISM y *Roseovarius nubinhibens* DSM. De acuerdo con Reller y colaboradores, la identificación de género y especie

por medio del gen 16S ribosomal requiere que el porcentaje de identidad entre la secuencia problema y la secuencia de referencia sea igual o mayor a 99% (Reller et al. 2007). Además, cabe destacar que el *E-value* obtenido en este análisis fue de 0.0. Dado que este parámetro representa que tan buena fue la alineación entre dos secuencias, un valor cercano al 0 es considerado el resultado más significativo en un análisis de BLAST (McEntyre y Ostella, 2002). A través de la combinación de estos resultados se pudo confirmar la identidad de la cepa comercial adquirida.

8.3 Caracterización del crecimiento de *R. nubinhibens* ISM en medios naturales mediante un estudio cinético

Para la propagación de microorganismos marinos se han empleado una gran variedad de medios de cultivo que van desde los más simples como el YTSS, el cual fue empleado originalmente para el aislamiento de *R. nubinhibens* (González et al. 2003), como aquellos que son más complejos, como el Bacto Marine Broth (BMB), el cual es complementado con vitaminas y minerales (Michael et al. 2016). Sin embargo, ambos pueden ser considerados como naturales por estar constituidos por sustancias complejas de origen natural.

De manera práctica, la aplicación de los medios YTSS y BMB llega a ser muy variada, ya que el medio YTSS ha sido empleado para el aislamiento, propagación, crecimiento, almacenamiento y como medio de cultivo rutinario (Gonzalez et al. 1997; González et al. 1997; Biers et al. 2008; Berdjeb et al. 2013; Paul W. D'Alvise, Olivera Magdenoska, Jette Melchiorson 2013; Wang et al. 2016). Además, puede llegar a ser suplementado con otros componentes para su evaluación en el desarrollo del crecimiento bacteriano (Seyedsayamdost et al. 2011; Alvise et al. 2016). Por otra parte, el medio BMB ha sido descrito como el medio de cultivo ideal para un crecimiento rápido de microorganismos marinos con la propiedad de ser personalizable cuando se requiere modificar su composición (Seyedsayamdost et al. 2011; Berdjeb et al. 2013; Wang et al. 2016).

Para *R. nubinhibens*, ambos medios permitieron lograr un máximo desarrollo de la bacteria, llegándose a observar una densidad óptica aproximadamente de

1.0 en el cultivo. Sin embargo, cabe destacar que se observó una mayor velocidad de crecimiento cuando la bacteria fue cultivada en el medio BMB llegando al punto máximo de crecimiento a las 18 horas, mientras que en el medio YTSS, la bacteria llegó al punto máximo a las 24 horas (Figura 6). De acuerdo con González y colaboradores, las bacterias suelen presentar un crecimiento más acelerado en el medio BMB debido a que éste presenta una concentración de NaCl apropiado para el crecimiento, el cual aparentemente es distinto a la concentración presente en el océano (Gonzalez *et al.* 1997; González *et al.* 1997). Además, puede atribuírsele la preferencia al medio BMB debido a que tiene 170 veces más carbón orgánico disuelto en comparación al agua marina (Figura 6) (Giovannoni and Stingl 2007).

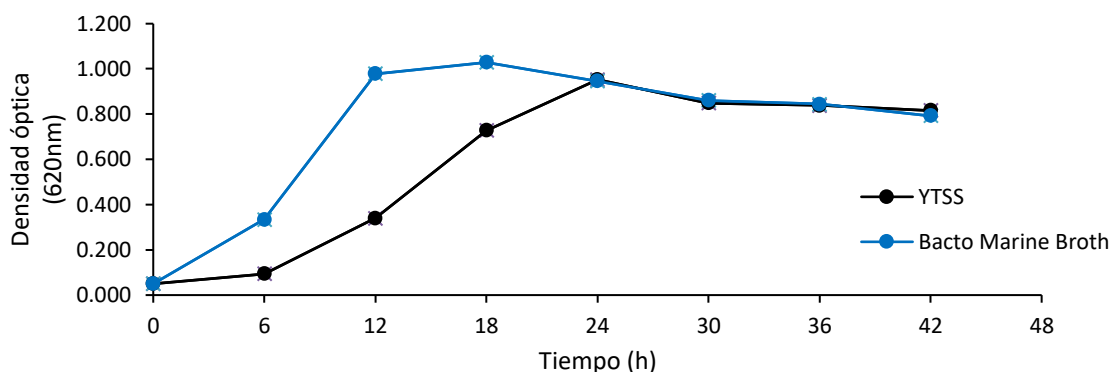


Figura 6. Curvas de crecimiento de la bacteria *R. nubinhibens* ISM en medios naturales.

8.4 Caracterización del crecimiento de *R. nubinhibens* ISM en medio mínimo mediante un estudio cinético

El medio mínimo marino o MMM, es un medio de cultivo sintético que ha sido diseñado para permitir la fácil personalización de los macronutrientes carbono, nitrógeno y fósforo, a fin de poder modificar las relaciones nutricionales o inclusive, como en nuestro caso, sustituir una fuente de fósforo inorgánico, por un fosfonato. Además, este medio está caracterizado por contener la mínima cantidad de sales necesarias para la subsistencia del microorganismo de estudio, garantizando su mínima interferencia con el ensayo biológico desarrollado.

Como puede verse en la Figura 7, la bacteria *R. nubinhibens* presentó una menor densidad óptica máxima y una fase exponencial más prolongada en comparación con el medio naturales YTSS y BMB. Esto puede deberse principalmente a la baja concentración de nutrientes en el medio, habiendo sido suministrado acetato de sodio a 10mM como fuente de carbono. En contraste, los medios YTSS y BMB suelen contener una gran diversidad de compuestos orgánicos, además de extracto de levadura que provee de concentraciones superiores de aminoácidos y compuestos nitrogenados (Gonzalez et al. 1997; González et al. 1997; Curson et al. 2017). Sin embargo, cabe destacar que, a pesar de la baja densidad óptica registrada, esta bacteria marina puede sobrevivir y desarrollarse correctamente en este medio sintético. Esto fue relevante para la investigación, ya que permitió realizar los posteriores ensayos de metabolización del metilfosfonato.

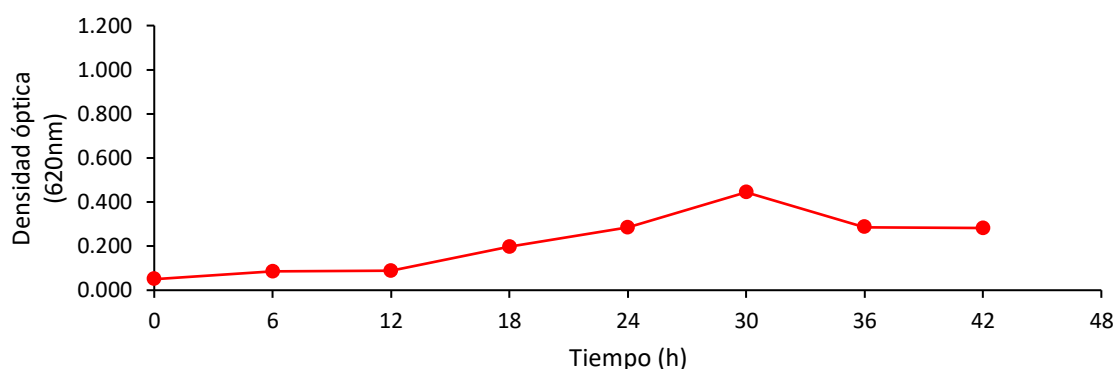


Figura 7. Curvas de crecimiento de la bacteria *R. nubinhibens* ISM en el medio mínimo marino (MMM).

8.5 Demostrar la capacidad de *R. nubinhibens* ISM para utilizar metilfosfonato como única fuente de fósforo

Habiéndose demostrado la capacidad de *R. nubinhibens* ISM para sobrevivir y desarrollarse en el medio sintético MMM, se prosiguió a demostrar mediante estudios cinéticos, que esta bacteria es capaz de utilizar metilfosfonato como única fuente de fósforo para su desarrollo. Para esto se llevaron a cabo bioensayos experimentales en medio MMM suplementados con metilfosfonato, y fueron comparados contra un control positivo que contenía fosfato de potasio, y un control negativo que no presentaba fuente de fósforo alguna.

Como puede observarse en la Figura 8, el patrón de crecimiento de *R. nubinhibens* en el medio MMM suplementado con las dos fuentes de fósforo fue muy similar, sugiriendo que la bacteria es capaz de emplear ambos compuestos del fósforo equivalentemente. Esto ha sido reportado también para la bacteria marina *Pelagibacteriales* str. HTCC7211, la cual logró alcanzar niveles de densidad celular similar al emplear metilfosfonato y fosfato de sodio a una concentración de 10 μ M (Carini et al. 2014). Curiosamente, *R. nubinhibens* logró alcanzar su máximo crecimiento a las 24 horas empleando el metilfosfonato como fuente de fósforo, lo cual indica que le resulta más fácil asimilar este compuesto que el fosfato inorgánico, con el cuál alcanzó su punto de máximo de crecimiento a las 30 horas de experimentación. Es posible que el rápido crecimiento de la bacteria frente al metilfosfonato sea debido la sinergia metabólica que ocurre entre la alta afinidad de la proteína transportadora de fosfonatos y la copia activa del operón de la C-P liasa responsable de la degradación de fosfonatos (Mende et al. 2017).

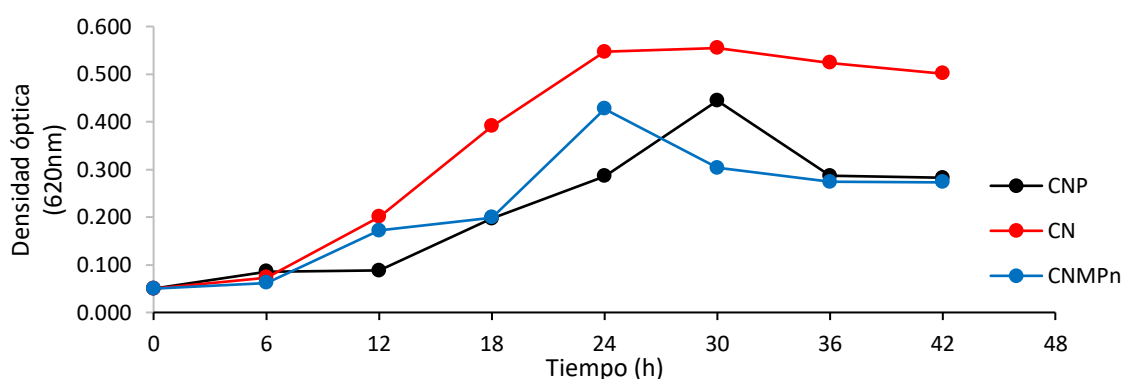


Figura 8. Curvas de crecimiento de la bacteria *R. nubinhibens* ISM en el medio mínimo marino (MMM) suplementado con (●) metilfosfonato 1mM, (●) fosfato de potasio 1mM, y (●) sin fuente de fósforo.

Martínez y colaboradores demostraron que algunas bacterias son capaces de crecer a concentraciones de metilfosfonato tan bajas como 0.1mM, teniendo su punto máximo de crecimiento aproximadamente a los 1.5 días para *Vibrio angustum* S14, 4 días para *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 y 9 días para *Planctomyces maris* DSM8797 (Martinez et al. 2010). Comparando nuestros

resultados, podemos observar que *R. nubinhibens* posee un desarrollo más rápido en comparación con las bacterias estudiadas por Martínez, habiendo alcanzado su punto máximo de crecimiento a las 24 horas. Esto podría resultar en una importante ventaja competitiva para la bacteria en el proceso de la adquisición de nutrientes presentes en el ecosistema marino.

Por otra parte, es importante destacar que el cultivo que no fue suministrado con fuente de fósforo presentó un comportamiento anormal e inesperado (Figura 8), ya que, al no presentarse una fuente de este elemento vital, se esperaría que las células fueran incapaces de continuar con su metabolismo y reproducirse. Sin embargo, la curva de crecimiento mostró un incremento lineal durante el periodo de 6 a 24 horas, continuando con una fase estacionaria de ligero decremento que continuó hasta el final del periodo experimental. Este comportamiento, aunque poco usual, ha sido observado en otras bacterias Gram positivas y negativas, en las cuales se ha reportado que el incremento de la densidad óptica de sus cultivos es debido principalmente a la acumulación de gránulos intracelulares que sirven para acumular carbono cuando los elementos esenciales como fósforo, nitrógeno y hierro se encuentran en concentraciones limitantes (Tan *et al.* 2014; Prados y Maicas 2016). A estos gránulos de carbono se les conoce como polihidroxialcanoatos (PHA) y son utilizados por las bacterias como reserva de carbono y energía. En bacterias especializadas, estos gránulos pueden llegar a representar el 90% del peso seco total (Madison y Huisman 1999; Lenz y Marchessault 2005).

Entre los microorganismos marinos identificados como productores de PHA se encuentran *Ruegeria pomeroyi* DSS-3, *Salipiger mucosus* y *Yangia* sp., todas ellas representantes de la familia *Rhodobacteraceae* (Chan *et al.* 2012; Riedel *et al.* 2014; Lau *et al.* 2017). Fue debido a esto que se supuso que la bacteria *R. nubinhibens*, al ser miembro de esta familia, era capaz de producir PHA como respuesta a la limitación de fósforo en el medio de cultivo.

A fin de comprobar la producción y acumulación de PHA en *R. nubinhibens* ISM, se realizaron tinciones específicas para este biopolímero en todas las muestras donde el crecimiento se encontraba en fase exponencial y su cambio hacia la fase estacionaria. Para esto se tiñeron las células con el colorante Azul

Nilo y los frotis fueron observados en un microscopio de fluorescencia. Como puede observarse en la Figura 9, los cultivos suministrados con fósforo no presentaron evidencia de la producción o acumulación de PHA, ya que no se presentó la fluorescencia roja brillante característica que indica la interacción del colorante con el biopolímero. Esto sugiere que las bacterias en estos cultivos se encontraron bajo condiciones óptimas de crecimiento, sin estrés por la falta de un nutriente esencial. En cambio, el cultivo que no fue suplementado con fósforo (C:N) mostró evidencia de una fuerte fluorescencia de color rojo brillante, atribuida a la presencia de gránulos de PHA (Ostle and Holt 1982; Oshiki et al. 2011). Éste fenómeno dio inicio entre las 12 y 18 horas de experimentación, alcanzándose un máximo de fluorescencia a las 36 horas. Cabe destacar que, bajo estas condiciones de cultivo, la morfología celular cambió radicalmente, observándose células más grandes y alargadas en comparación con los medios de cultivo suministrado con una fuente de fósforo (véase Figura 10). Esto ha sido vinculado directamente a la acumulación de PHA (Mravec et al. 2016). Por otra parte, de acuerdo con análisis realizados por Page y Tenove, existe una alta correlación entre la intensidad de la fluorescencia con la concentración de PHB en una célula, por lo que se puede sugerir que *R. nubinhibens* lleva a cabo una acumulación de PHA de manera lineal con respecto al tiempo (Page and Tenove 1996).

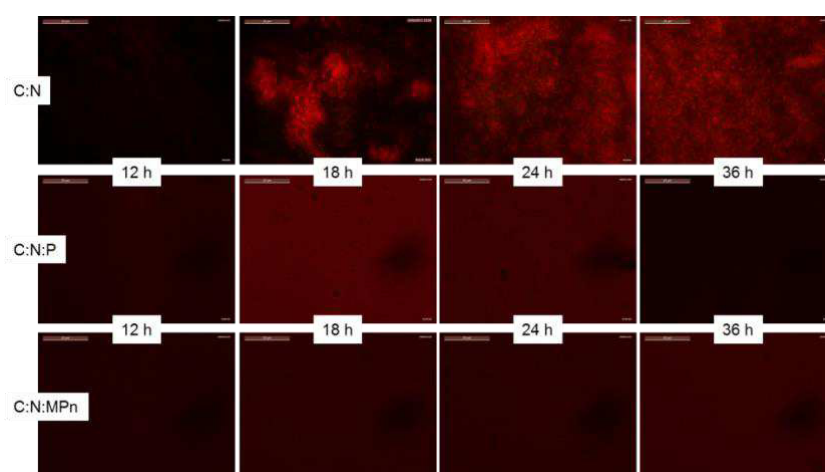


Figura 9. Micrografías de fluorescencia para la prueba de producción de PHA en cultivos de la bacteria *R. nubinhibens* ISM crecida en medio mínimo marino (MMM) suplementado (●) sin fuente de fósforo, (●) con fosfato de potasio 1mM, y (●) con metilfosfonato 1mM. (Magnificación 100x).

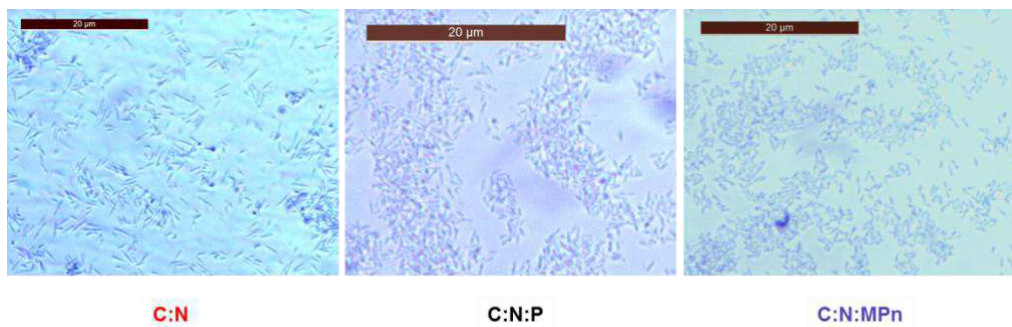


Figura 10. Micrografías en campo claro de la bacteria *R. nubinhibens* ISM crecida en medio mínimo marino (MMM) suplementado (●) sin fuente de fósforo, (●) con fosfato de potasio 1mM, y (●) con metilfosfonato 1mM. (Magnificación 100x).

Para confirmar que la acumulación de PHA en este cultivo (C:N) era directamente relacionada a la concentración de fosfato en el medio, este ion fue cuantificado a lo largo de la cinética de crecimiento. Como puede observarse en la Figura 11, el fosfato no pudo ser cuantificado durante el periodo de experimentación, indicando que este ion se encontraba por debajo del límite de detección, el cual, según el fabricante es de 0.05 μM (H. and E. 1975; Pipke et al. 1987; Sviridov et al. 2012).

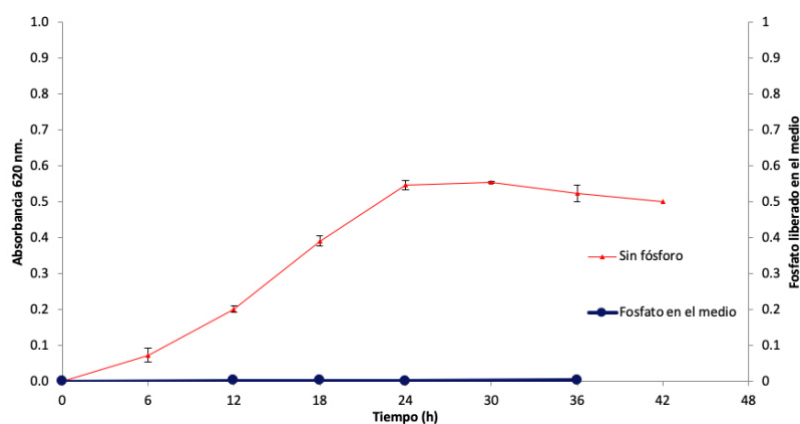


Figura 11. Monitoreo de la concentración del ion fosfato durante el cultivo de la bacteria *R. nubinhibens* ISM en el medio MMM sin suplemento de fósforo.

Por otra parte, cabe destacar que el cultivo que fue suministrado metilfosfonato inicia con una concentración nula de fosfato en el medio, la cual, va incrementándose conforme avanza la cinética (Figura 12). Este resultado es importante ya que confirma que *i)* el reactivo Biomol Green, al ser específico para el ion fosfato, no interacciona con el grupo fosfonato para dar una señal cuantificable, aún y a concentraciones tan elevadas como 1mM. Además, *ii)* el incremento del ion fosfato en el medio sugiere que éste es derivado del metabolismo del metilfosfonato por parte de la bacteria, ya que este compuesto representó la única fuente de átomos de fósforo en el medio, pero, sobre todo, *iii)* la metabolización del metilfosfonato ocurre de manera independiente a los niveles de fosfato en el medio, ya que la concentración del ion fosfato va incrementándose con el paso del tiempo, aún y cuando la concentración del mismo alcanza el 10% de la concentración inicial. Este porcentaje representa cerca de 100 μ M, una concentración mucho mayor que la concentración de 0.4 μ M que suele inhibir la señal del sistema PhoR/PhoB, la cual tiende a reprimir a la enzima C-P liasa (Lamarche et al. 2008; Hsieh y Wanner 2010). Debido a esto, puede sugerirse que la bacteria marina *R. nubinhibens* posee una encima responsable del metabolismo del metilfosfonato que no es sensible a la concentración exógena de fosfato, lo que podría conllevar a la biotransformación continua de esta molécula en gas metano. Debido a esta característica y a que la bacteria suele encontrarse en la superficie del océano, la convierte en una potencial candidata para explicar la producción *in situ* del metano que da origen a la paradoja del metano oceánico.

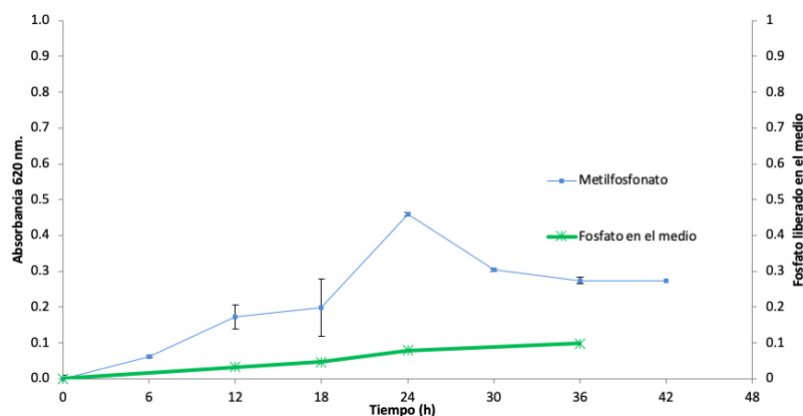
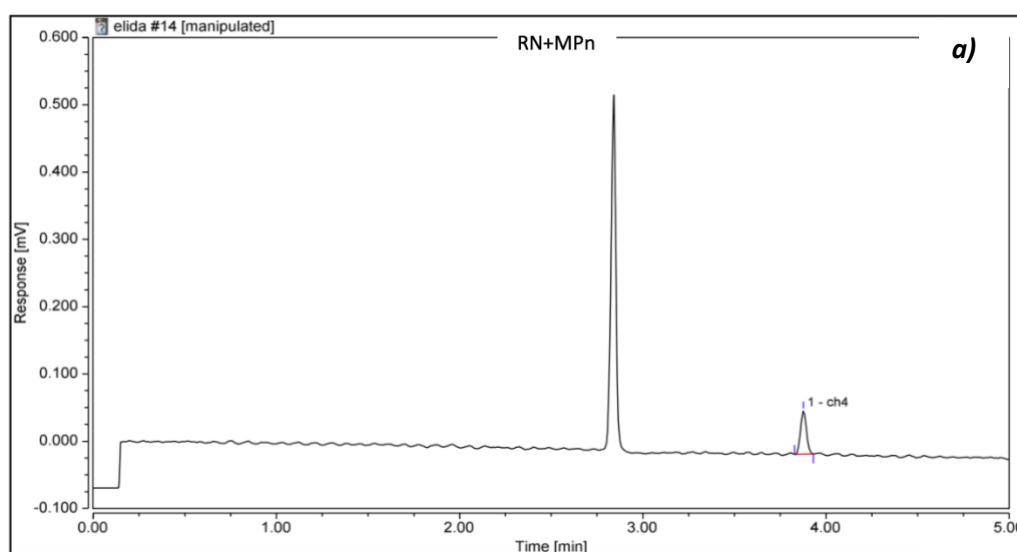
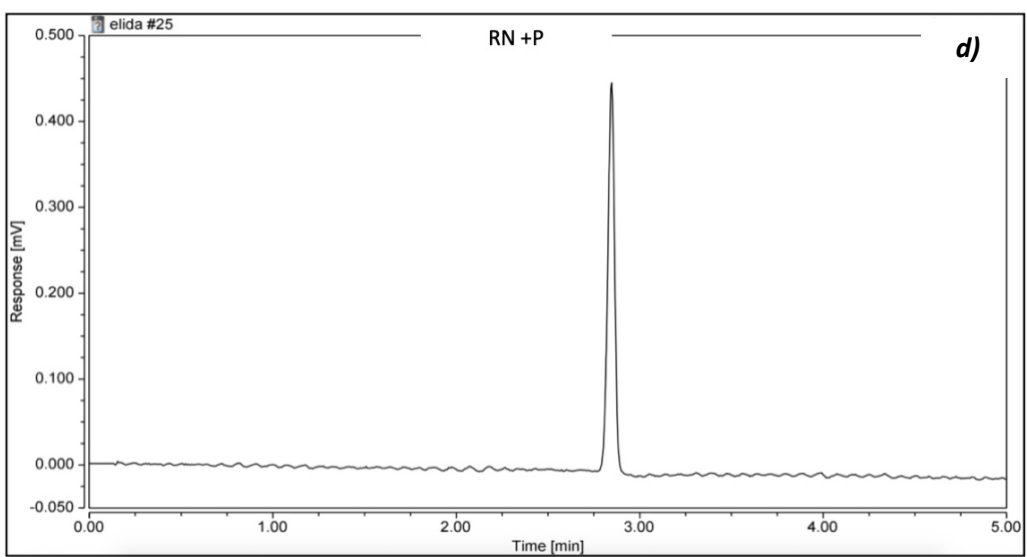
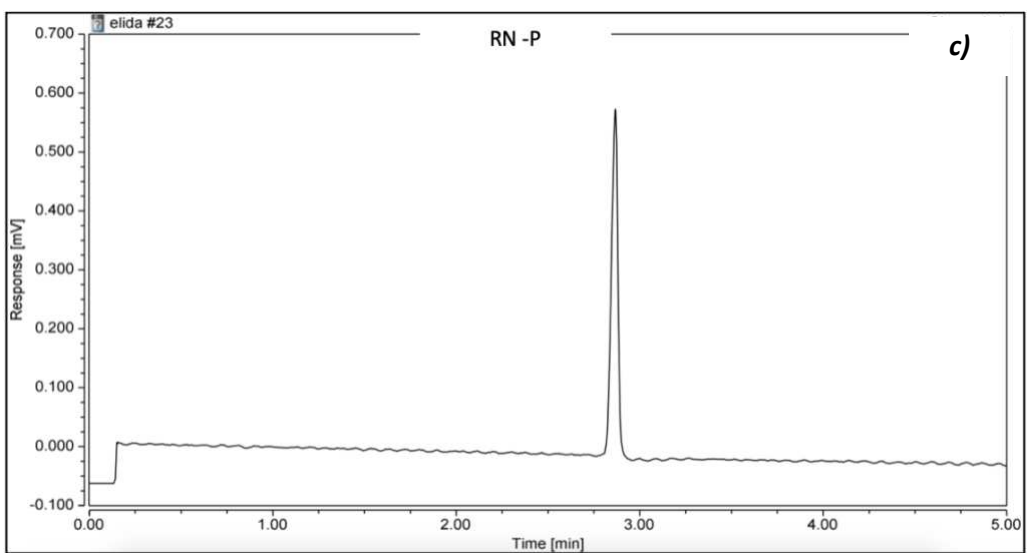
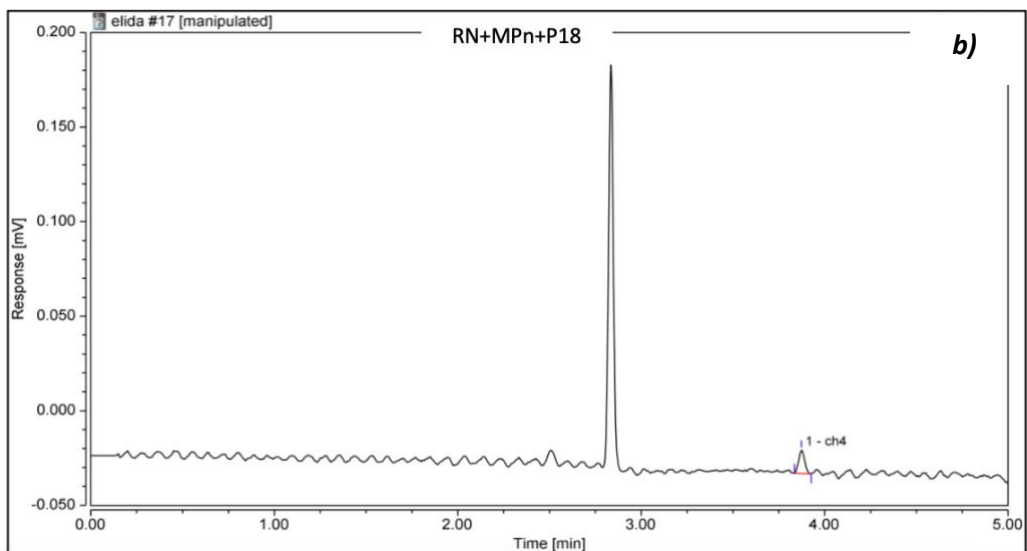


Figura 12. Monitoreo de la concentración del ion fosfato durante el cultivo de la bacteria *R. nubinhibens* ISM en el medio MMM suplemento con metilfosfonato.

8.6 Cuantificación de metano producto de la degradación de metilfosfonato por la bacteria *R. nubinhibens* ISM

A fin de confirmar la biotransformación del metilfosfonato a metano en los bioensayos, se realizaron muestreos a las 24 horas de incubación y se analizaron por cromatografía de fases. Como puede observarse en la Figura 17, se detectó una señal muy amplia en todos los cromatogramas al tiempo de retención 2.75 minutos, el cual corresponde al gas acarreador. No obstante, en los cultivos de *R. nubinhibens* suplementados con metilfosfonato (Figura 13a) y metilfosfonato+fósforo de potasio (Figura 13b), logró detectarse un pico pequeño con un tiempo de retención de 3.87 minutos. Este pico cromatográfico corresponde al gas metano producto de la biotransformación del metilfosfonato. De nueva cuenta, la presencia de metano en la fase vapor del bioensayo suplementado con metilfosfonato+fósforo de potasio, aunada a la concentración de fósforo en el medio de cultivo, indica que la bacteria *R. nubinhibens* es capaz de metabolizar metilfosfonato sin ser susceptible a la concentración exógena de fósforo en el medio. Ya que la única enzima conocida capaz de degradar metilfosfonato es la C-P liasa (Karl et al. 2008), nuestros resultados demuestran que *R. nubinhibens* posee una enzima desregulada, que en términos ecológicos, podría estar vinculada a la producción in situ del metano que se genera en la superficie del océano.





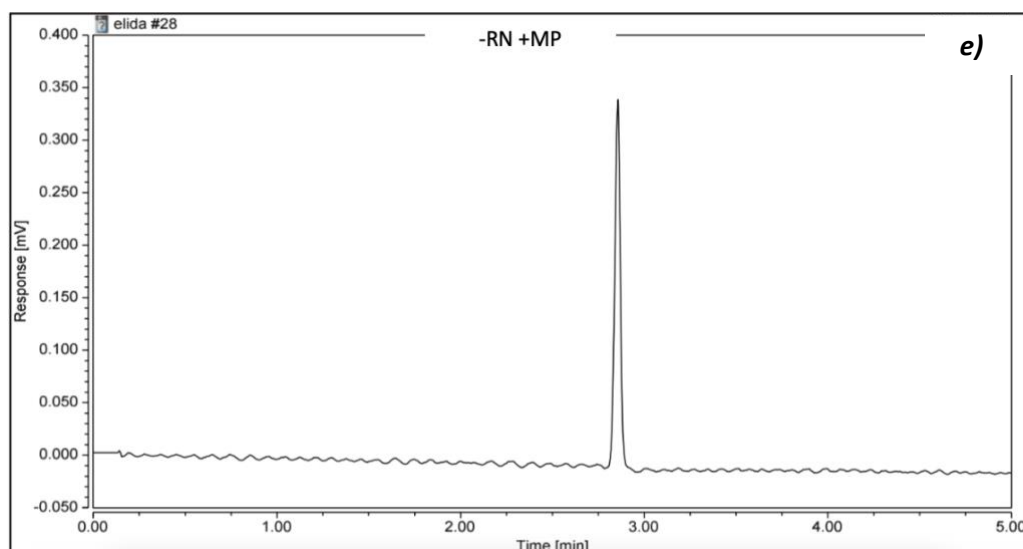


Figura 13. Cromatogramas de la detección de metano en diferentes condiciones de cultivo **a)** *R. nubinihibens* ISM + metilfosfonato, **b)** *R. nubinihibens* ISM + metilfosfonato + 0.1 mM de Fosfato de potasio a las 18 horas de crecimiento, **c)** *R. nubinihibens* ISM sin fuente de fósforo, **d)** *R. nubinihibens* ISM + K_2HPO_4 , **e)** metilfosfonato sin inocular

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por Karl y colaboradores muestra que ellos al utilizar agua de mar como muestra y añadiéndole $1\mu M$ de metilfosfonato observaron crecimiento celular mientras se producía metano al igual que nuestros resultados obtenidos en la Figura 12 y figura 13 inciso a y b. También observó que en ausencia de metilfosfonato utilizando el fosfato como fuente de fósforo no se detectó metano al igual que nosotros en la figura 13 inciso d (Karl et al. 2008; Martínez et al. 2013). Este mismo comportamiento se observa en las cianobacteria *N. spumigena* UHCC 0039 y *N. spumigena* UHCC 0060 (Teikari et al. 2018) *Pseudomonas* sp. (Wang et al. 2017), *Pelagibacter* sp. str. HTCC7211 (Carini et al. 2014).

Karl y colaboradores observaron que bajo $1\mu M$ de fosfato en el ambiente la regulación de la producción de metano disminuye ya que el fosfato es considerado el sustrato preferido para el crecimiento de los microorganismos en el océano por lo tanto deja de utilizar el metilfosfonato (Karl et al. 2008). En otro estudio Carini y colaboradores en el 2014 hicieron una prueba para comprobar si *Pelagibacter* sp. str. HTCC7211 era capaz de producir metano por medio de la degradación de metilfosfonato ($10\mu M$) si estaba en presencia de fósforo, sus resultados muestran una represión del 98% de la producción de

metano cuando la bacteria se encuentra en presencia de $10\mu\text{M}$ de NaH_2PO_4 (Carini et al. 2014). A diferencia de nuestros resultados donde se puede observar la producción de metano aún y cuando hay altas concentraciones de fósforo en el ambiente ($78.96\mu\text{M}$).

En otro estudio realizado en el 2016 por Yao y colaboradores con bacterias presentes en la superficie de un lago logran aislar 4 bacterias capaces de utilizar el metilfosfonato como única fuente de fósforo. *Agrobacterium tumefaciens* (LM-1), *Rizobium sp.* (LM-5), *Agrobacterium tumefaciens* (LM6-1), *Pantoea ananatis* (LM-Y). Observaron que, LM-Y fue capaz de producir metano a partir de 0.2mM de metilfosfonato, pero, al agregarle 0.2mM de K_2HPO_4 la producción de metano fue inhibida al 100%. En estudios posteriores los investigadores descubrieron que la inhibición inicia a partir de $30\mu\text{M}$ de K_2HPO_4 . Por otra parte las cepas LM-1, LM-5 y LM-6 crecieron y produjeron metano en presencia de metilfosfonato a una concentración de 0.2mM y al añadirle 0.2mM de K_2HPO_4 la producción de metano disminuyó entre 40-60% (Yao et al. 2016). Estos resultados son muy similares a los obtenidos en este estudio a ya que no se muestra una inhibición del crecimiento en presencia de K_2HPO_4 pero, habría que hacer mas estudios al respecto para ver la concentración mínima de K_2HPO_4 para observar o no una represión en la producción de metano ya.

La súper saturación de metano en el océano en relación con la atmósfera se conoce desde 1971 (Lamontagne et al. 1971) y a partir del 2008 por Karl y colaboradores (Karl et al. 2008) se le dio mas relevancia a la paradoja del metano oceánico.

La formación aeróbica de metano a partir de la desfosforilización del metilfosfonato bajo estrés fisiológico de fósforo el microorganismo usa la enzima C-P liasa liberando metano y fósforo en forma de fosfato, es la hipótesis más sobresaliente a lo largo de los ya casi 50 años de estudio y podría ser la clave perdida para el entendimiento del un flujo constante de metano del océano hacia la atmósfera (Karl et al. 2008; Del Valle and Karl 2014). Sin embargo, muchas dudas y descubrimientos se siguen dando ya que las piezas del rompecabezas aún no están completas.

En estudios más recientes se ha encontrado que la enzima metilfosfonato sintasa (encargada de la síntesis de metilfosfonato) se encuentra ampliamente distribuida en el microbioma marino y en el género *Pelagibacter ubique* (perteneciente al clado SAR11 de las α -proteobacteria) (Born et al. 2017). Mientras tanto Repeta y colaboradores en el 2016 demuestran que no existe una concentración detectable de metilfosfonato puro en el océano. Pero, proponen que dentro de la composición de la materia orgánica disuelta el metilfosfonato puede estar en forma de éster, aunque la materia orgánica disuelta no se ha estudiado a profundidad. En este estudio comprueban la presencia de polisacáridos que pueden integrar ésteres de metilfosfonato y puede ser degradado (por la C-P liasa) formando metano más la capacidad que tienen algunas bacterias de degradar el metilfosfonato independientemente de las concentraciones de fósforo en el ambiente (encontrado en este estudio) nos puede ir acercando cada vez más a la resolución de la paradoja del metano oceánico (Repeta et al. 2016).

9. CONCLUSIONES

La caracterización macroscópica de *R. nubinhibens* ISM demostró que esta bacteria forma colonias circulares con margen crema y centro color naranja-marrón, mientras que, a nivel microscópico, se determinó que forma bacillos pequeños Gram negativos. La secuenciación del gen 16S ribosomal demostró que la bacteria presentaba 100% de similitud con la cepa ISM.

La bacteria *R. nubinhibens* ISM es capaz de crecer en diferentes medios de cultivo naturales, presentando a su vez un crecimiento más acelerado en el medio BMB. Por otra parte, el crecimiento en el medio sintético MMM fue menor en comparación con los medios naturales. Sin embargo, éste medio resultó ideal para personalizar las fuentes nutricionales para los bioensayos.

R. nubinhibens ISM fue capaz de crecer en presencia de metilfosfonato como única fuente de fósforo, logrando alcanzar niveles similares de densidad celular que el cultivo suministrado con K_2HPO_4 . Por otra parte, se demostró que *R. nubinhibens* ISM al no contar con fuente de fósforo en el medio, es capaz de producir y acumular PHB en su interior a manera de protegerse de la inanición de fósforo. La morfología microscópica de las bacterias cambió de manera considerable al acumular PHB en su interior, ya que las células se vuelven más grandes y alargadas.

La capacidad de la bacteria marina para metabolizar metilfosfonato no fue inhibida debida a altas concentraciones de fósforo inorgánico en el medio ($98.62\mu M$), ya que logró transformar más del 10% de la concentración inicial de metilfosfonato (1mM) a fosfato inorgánico y liberarlo al medio.

La presencia del regulador *lysR* en el operón de la C-P liasa en *R. nubinhibens* ISM podría ser responsable de su capacidad de expresar la enzima en altas concentraciones de fósforo permitiéndole subsistir en un nicho ecológico tan hostil como el océano.

La presencia de metano en la fase vapor del bioensayo suplementado con metilfosfonato y fosfato de potasio demuestra que la bacteria *R. nubinhibens* es capaz de biotransformar el metilfosfonato a metano, de manera independiente

a los niveles exógenos del medio. Con esto, se puede sugerir que esta bacteria propia de la superficie del océano, podría ser responsable de la generación de metano *in situ* que da origen a la paradoja del metano oceánico.

10. PERSPECTIVAS

1. Implementar a *R. nubinhibens* ISM en un sistema de Biorremediación de contaminantes organofosforados como el glifosato en matrices de agua contaminadas.
2. Estudiar la transferencia horizontal de genes asociada a la adaptación a un medio ambiente hostil como lo es el océano.
3. Estudiar los mecanismos de inserción y delección de genes en microorganismos marinos gracias a su rápida capacidad que tienen para adaptarse.
4. Utilizar los mecanismos de regulación (reguladores transcripcionales) con potencial en la biorremediación por medio de ingeniería genética en cepas de microorganismos potencialmente útiles para estos fines.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adams MM, Gómez-García MR, Grossman AR, Bhaya D (2008) Phosphorus deprivation responses and phosphonate utilization in a thermophilic *Synechococcus* sp. from microbial mats. *J Bacteriol* 190:8171–8184. doi: 10.1128/JB.01011-08
- Alvise PWD, Phippen CBW, Nielsen KF, Gram L (2016) Influence of iron on the production of the antibacterial compound tropodithietic acid and its non-inhibitory analog in *Phaeobacter inhibens* Paul. 82:15–16. doi: 10.1128/AEM.02992-15.Editor
- Benitez-Nelson CR (2000) The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. *Earth Sci Rev* 51:109–135. doi: 10.1016/S0012-8252(00)00018-0
- Benitez-Nelson CR, O'Neill Madden LP, Styles RM, et al (2007) Inorganic and organic sinking particulate phosphorus fluxes across the oxic/anoxic water column of Cariaco Basin, Venezuela. *Mar Chem* 105:90–100. doi: 10.1016/j.marchem.2007.01.007
- Berdjeb L, Pelletier É, Pellerin J, et al (2013) Contrasting responses of marine bacterial strains exposed to carboxylated single-walled carbon nanotubes. *Aquat Toxicol* 144–145:230–241. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.10.013
- Biers EJ, Wang K, Pennington C, et al (2008) Occurrence and Expression of Gene Transfer Agent Genes in Marine Bacterioplankton. *Cultures* 74:2933–2939. doi: 10.1128/AEM.02129-07
- Björkman KM, Karl DM (2003) Bioavailability of dissolved organic phosphorus in the euphotic zone at Station ALOHA, North Pacific Subtropical Gyre. *Limnol Oceanogr* 48:1049–1057. doi: 10.4319/lo.2003.48.3.1049
- Born DA, Ulrich EC, Ju K-S, et al (2017) Structural basis for methylphosphonate biosynthesis. *Science* (80-) 358:1336–1339. doi: 10.1126/science.aao3435
- Carini P, White AE, Campbell EO, Giovannoni SJ (2014) Methane production by phosphate-starved SAR11 chemoheterotrophic marine bacteria. *Nat Commun* 5:4346. doi: 10.1038/ncomms5346
- Chan LK, Newton RJ, Sharma S, et al (2012) Transcriptional changes underlying elemental stoichiometry shifts in a marine heterotrophic bacterium. *Front Microbiol* 3:1–24. doi: 10.3389/fmicb.2012.00159
- Clark LL, Ingall ED, Benner R (1999) Marine organic phosphorus cycling: Novel insights from nuclear magnetic resonance. *Am J Sci* 299:724–737. doi: 10.2475/ajs.299.7-9.724
- Creating Bacterial Glycerol Stocks for Long-term Storage of Plasmids. Consultado en Agosto 23, 2017, desde: <https://www.addgene.org/protocols/create-glycerol-stock/>
- Curson ARJ, Liu J, Bermejo Martínez A, et al (2017) Dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in marine bacteria and identification of the key gene in this process. *Nat Microbiol* 2:. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.9
- Del Valle DA, Karl DM (2014) Aerobic production of methane from dissolved water-column methylphosphonate and sinking particles in the North Pacific Subtropical Gyre. *Aquat Microb Ecol* 73:93–105. doi: 10.3354/ame01714
- Dyhrman S, Ammerman J, Van Mooy B (2007) Microbes and the Marine Phosphorus Cycle. *Oceanography* 20:110–116. doi: 10.5670/oceanog.2007.54
- Dyhrman ST, Chappell PD, Haley ST, et al (2006) Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Nature* 439:68–71. doi: 10.1038/nature04203

- Enzo ILS (2017) Biomol Green Product Manual
- Gebhard S, Busby JN, Fritz G, et al (2014) Crystal structure of PhnF, a GntR-family transcriptional regulator of phosphate transport in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 196:3472–3481. doi: 10.1128/JB.01965-14
- Giovannoni S, Stingl U (2007) The importance of culturing bacterioplankton in the “omics” age. *Nat Rev Microbiol* 5:820–826. doi: 10.1038/nrmicro1752
- González JM, Covert JS, Whitman WB, et al (2003) *Silicibacter pomeroyi* sp. nov. and *Roseovarius nubinhibens* sp. nov., dimethylsulfoniopropionate-demethylating bacteria from marine environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1261–1269. doi: 10.1099/ijs.0.02491-0
- González J, Mayer F, Moran M, et al (1997) *Microbulbifer hydrolyticus* gen. nov., sp. nov., and *Marinobacterium georgiense* gen. nov., sp. nov., Two Marine Bacteria from a Lignin-Rich Pulp Mill Waste Enrichment Community. *Int J Syst Evol Microbiol* 47:369
- Gonzalez JM, Mayer F, Moran MA, Hodson RE (1997) *Sagittula stellata* gen. nov., sp. nov., a Lignin-Transforming Bacterium from a Coastal Environment. *Int J Syst Bacteriol* 47:773–780
- Gorelik M, Lunin V V, Skarina T, Savchenko A (2006) Structural characterization of GntR / HutC family signaling domain. 1506–1511. doi: 10.1110/ps.062146906.dominated
- H. HH, E. DJ (1975) Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1 - 5 nanomole range. *Anal Biochem* 63:607–613. doi: 10.1016/0003-2697(75)90388-7
- Hanna M, Xiao W (2006) Isolation of Nucleic Acids. In: Xiao W (ed) *Methods in Molecular Biology*, Second. Humana Press Inc, Totowa, NJ, pp 015–020
- Hove-Jensen B, McSorley FR, Zechel DL (2011) Physiological role of phnP-specified phosphoribosyl cyclic phosphodiesterase in catabolism of organophosphonic acids by the carbon-phosphorus lyase pathway. *J Am Chem Soc* 133:3617–3624. doi: 10.1021/ja1102713
- Hove-Jensen B, Rosenkrantz TJ, Zechel DL, Willemoës M (2010) Accumulation of intermediates of the carbon-phosphorus lyase pathway for phosphonate degradation in phn mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 192:370–374. doi: 10.1128/JB.01131-09
- Hsieh YJ, Wanner BL (2010) Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Curr Opin Microbiol* 13:198–203. doi: 10.1016/j.mib.2010.01.014
- Imazu K, Tanaka S, Kuroda A, et al (1998) Enhanced utilization of phosphonate and phosphite by *Klebsiella aerogenes*. *Appl Environ Microbiol* 64:3754–3758
- Jain D (2015) Allosteric control of transcription in GntR family of transcription regulators: A structural overview. *IUBMB Life* 67:556–563. doi: 10.1002/iub.1401
- Kamat SS, Williams HJ, Raushel FM (2011) Intermediates in the transformation of phosphonates to phosphate by bacteria. *Nature* 480:570–573. doi: 10.1038/nature10622
- Karl DM, Beversdorf L, Björkman KM, et al (2008) Aerobic production of methane in the sea. *Nat Geosci* 1:473–478. doi: 10.1038/ngeo234
- Karl DM, Tilbrook BD (1994) Production and transport of methane in oceanic particulate organic matter. *Nature* 367:566–568
- Lamarche MG, Wanner BL, Crépin S, Harel J (2008) The phosphate regulon and bacterial virulence: A regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 32:461–473. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x

- Lamontagne R a., Swinnerton W, Linnenbom VJ (1974) C1-C4 hydrocarbons in the North and South Pacific. *Tellus A Dyn Meteorol Oceanogr* 20375:71–77
- Lamontagne R a., Swinnerton JW, Linnenbom VJ (1971) Nonequilibrium of carbon monoxide and methane at the air-sea interface. *J Geophys Res* 76:5117–5121. doi: 10.1029/JC076i021p05117
- Lamontagne R a, Swinnerton JW, Linnenbom VJ, Smith WD (1973) Methane Concentrations in Various Marine Environments AND Atmospheric methane centration of 1 . 24 ppm for the atmosphere above number of stranded fjords and lakes [Str • m , decomposition of organic waters the mechanism of methane production appears to . 78:5317–5324
- Lau N-S, Sam K-K, Amirul AA-A (2017) Genome features of moderately halophilic polyhydroxyalkanoate-producing *Yangia* sp. CCB-MM3. *Stand Genomic Sci* 12:12. doi: 10.1186/s40793-017-0232-8
- Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Opening of Ampoules and Rehydration of Dried Cultures
- Lenz RW, Marchessault RH (2005) Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* 6:1–8. doi: 10.1021/bm049700c
- Madison LL, Huisman GW (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:21–53. doi: <p></p>
- Martinez A, Tyson GW, Delong EF (2010) Widespread known and novel phosphonate utilization pathways in marine bacteria revealed by functional screening and metagenomic analyses. *Environ Microbiol* 12:222–238. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02062.x
- Martínez A, Ventouras LA, Wilson ST, et al (2013) Metatranscriptomic and functional metagenomic analysis of methylphosphonate utilization by marine bacteria. *Front Microbiol* 4:1–18. doi: 10.3389/fmicb.2013.00340
- McEntyre J, Ostell J, editors. The NCBI Handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21101/?depth=2k>
- McGrath JW, Chin JP, Quinn JP (2013) Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nat Rev Microbiol* 11:412–9. doi: 10.1038/nrmicro3011
- McGrath JW, Ternan NG, Quinn JP (1997) Utilization of organophosphonates by environmental micro-organisms. *Lett Appl Microbiol* 24:69–73. doi: 10.1046/j.1472-765X.1997.00350.x
- Mende DR, Ferrón S, Repeta DJ, et al (2017) Isolation and Characterization of Bacteria That Degrade Phosphonates in Marine Dissolved Organic Matter. *Front Microbiol* 8:1–16. doi: 10.3389/fmicb.2017.01786
- Metcalf WW, Griffin BM, Cicchillo RM, et al (2012) Synthesis of Methylphosphonic Acid by Marine Microbes: A Source for Methane in the Aerobic Ocean. *Science* (80-) 337:1104–1107. doi: 10.1126/science.1219875
- Metcalf WW, Wanner BL (1993) Mutational analysis of an *Escherichia coli* fourteen-gene operon for phosphonate degradation, using *TnphoA*’ elements. *J Bacteriol* 175:3430–3442
- Michael V, Frank O, Bartling P, et al (2016) Biofilm plasmids with a rhamnose operon are widely distributed determinants of the ‘swim-or-stick’ lifestyle in roseobacters. *ISME J* 10:2498–2513. doi: 10.1038/ismej.2016.30
- Monds RD, Newell PD, Schwartzman J a, Toole G a O (2006) Conservation of the Pho regulon in Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Appl Environ Microbiol* 72:1910–1924. doi: 10.1128/AEM.72.3.1910

- Mravec F, Obruca S, Krzyzanek V, et al (2016) Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiol Lett* 363:1–7. doi: 10.1093/femsle/fnw094
- Ostle AG, Holt JG (1982) Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-3- Hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* 44:238–241
- Osborne CA, Galic M, Sangwan P, Janssen PH (2005) PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiol Lett* 248:183–187. doi: 10.1016/j.femsle.2005.05.043
- Oshiki M, Satoh H, Mino T (2011) Rapid quantification of polyhydroxyalkanoates (PHA) concentration in activated sludge with the fluorescent dye Nile blue A. *Water Sci Technol* 64:747–753. doi: 10.2166/wst.2011.707
- Page WJ, Tenove CJ (1996) Quantitation of Poly-B-Hydroxybutyrate by fluorescence of bacteria and granules stained with Nile Blue A. 10:215–220
- Parker GF, Higgins TP, Hawkes T, Robson RL (1999) *Rhizobium* (Sinorhizobium) *meliloti* phn genes: Characterization and identification of their protein products. *J Bacteriol* 181:389–395
- Paul W, D'Alvise, Olivera Magdenoska, Jette Melchiorson KFN and LG (2013) Biofilm formation and antibiotic production in *Ruegeria mobilis* are influenced by intracellular concentrations of cyclic dimeric guanosinmonophosphate. *Environ Microbiol* 16:1252–1266. doi: 10.1111/1462-2920.12265
- Peck SC, Chekan JR, Ulrich EC, et al (2015) A common late-stage intermediate in catalysis by 2-hydroxyethyl-phosphonate dioxygenase and methylphosphonate synthase. *J Am Chem Soc* 137:3217–3220. doi: 10.1021/jacs.5b00282
- Pipke R, Amrhein N, Jacob GS, et al (1987) Metabolism of Glyphosate in an *Arthrobacter*-Sp Glp-1. *Eur J Biochem* 165:267–273
- Prados E, Maicas S (2016) Bacterial Production of Hydroxyalkanoates (PHA). *Univers J Microbiol Res* 4:23–30. doi: 10.13189/ujmr.2016.040104
- Reeburgh W (2007) Oceanic methane biogeochemistry. *Am Chem Soc* 107:486–513. doi: 10.1021/cr050362v
- Reizer A, Deutscher J, Saier MH, Reizer J (1991) Analysis of the gluconate gnt operon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 5:1081–1089. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb01880.x
- Reller LB, Weinstein MP, Petti CA (2007) Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clin Infect Dis* 44:1108–1114. doi: 10.1086/512818
- Repeta DJ, Ferrón2 S, Sosa2 OA, et al (2016) Marine methane paradox explained by bacterial degradation of dissolved organic matter. *Nat Geosci*
- Riedel T, Spring S, Fiebig A, et al (2014) Genome sequence of the exopolysaccharide-producing *Salipiger mucosus* type strain (DSM 16094T), a moderately halophilic member of the *Roseobacter* clade. *Stand Genomic Sci* 9:1333–1345. doi: 10.4056/sigs.4909790
- Santos-Beneit F (2015) The Pho regulon: A huge regulatory network in bacteria. *Front Microbiol* 6:1–13. doi: 10.3389/fmicb.2015.00402
- Schowaneck D, Verstraete W (1990) Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 56:895–903
- Seyedsayamdost MR, Case RJ, Kolter R, Clardy J (2011) The Jekyll-and-Hyde chemistry of *phaeobacter gallaeciensis*. *Nat Chem* 3:331–335. doi: 10.1038/nchem.1002
- Shao Z, Blodgett JA V, Circello BT, et al (2008) Biosynthesis of 2-hydroxyethylphosphonate, an

- unexpected intermediate common to multiple phosphonate biosynthetic pathways. *J Biol Chem* 283:23161–23168. doi: 10.1074/jbc.M801788200
- Sviridov A V., Shushkova T V., Zelenkova NF, et al (2012) Distribution of glyphosate and methylphosphonate catabolism systems in soil bacteria *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:787–796. doi: 10.1007/s00253-011-3485-y
- Tahuer RK (1998) SPECIAL Biochemistry of methanogenesis : a tribute to. *Microbiology* 2377–2406
- Tan GYA, Chen CL, Li L, et al (2014) Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers (Basel)* 6:706–754. doi: 10.3390/polym6030706
- Teikari JE, Fewer DP, Shrestha R, et al (2018) Strains of the toxic and bloom-forming *Nodularia spumigena* (cyanobacteria) can degrade methylphosphonate and release methane. *ISME J* 12:1619–1630. doi: 10.1038/s41396-018-0056-6
- Thermo Scientific (2016) TRACE 1300 and TRACE 1310 Gas Chromatographs User Guide
- Vera M, Pagliai F, Guiliani N, Jerez CA (2008) The chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans* can survive under phosphate-limiting conditions by expressing a C-P lyase operon that allows it to grow on phosphonates. *Appl Environ Microbiol* 74:1829–1835. doi: 10.1128/AEM.02101-07
- Vershinina OA, Znamenskaya L V. (2002) The Pho regulons of bacteria. *Microbiology* 71:497–511. doi: 10.1023/A:1020547616096
- Villarreal-Chiu JF, Casey W, O'Connor KE, et al (2012a) Biosynthesis and accumulation of polyhydroxybutyrate by the marine bacterium *Roseovarius nubinhibens* ISM. *J Pet Environ Biotechnol* 3:227
- Villarreal-Chiu JF, Quinn JP, McGrath JW (2012) The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Front Microbiol* 3:1–13. doi: 10.3389/fmicb.2012.00019
- Villarreal-Chiu, J. (2011). *Organophosphonate Metabolism by Marine Bacteria*. Doctorado. Queen's University, Belfast.
- Wackett LP, Wanner BL, Venditti CP, Walsh CT (1987) Involvement of the Phosphate Regulon and the *psiD* Locus in Carbon-Phosphorus Lyase Activity of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 169:1753–1756
- Wadham JL, Arndt S, Tulaczyk S, et al (2012) Potential methane reservoirs beneath Antarctica. *Nature* 488:633–637. doi: 10.1038/nature11374
- Walsh, David A. and Hallam SJ (2011) Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats. In: de Bruijn FJ (ed) Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats. Wiley-Blackwell, pp 253–267
- Wang Q, Dore JE, McDermott TR, 1 (2017) Methylphosphonate Metabolism by *Pseudomonas* sp. Populations Contributes to the Methane Oversaturation Paradox in an Oxidic Freshwater Lake. Wiley-Blackwell Soc Appl Microbiol
- Wang R, Gallant É, Seyedsayamdost MR (2016) Investigation of the Genetics and Biochemistry of Roseobacticide Production in the Roseobacter Clade Bacterium *Phaeobacter inhibens*. *MBio* 7:1–10. doi: 10.1128/mbio.02118-15
- White AK, Metcalf WW (2004) Two C - P Lyase Operons in *Pseudomonas stutzeri* and Their Roles in the Oxidation of Phosphonates , Phosphite , and Hypophosphite. 186:4730–4739. doi: 10.1128/JB.186.14.4730

- White AK, Metcalf WW (2007) Microbial Metabolism of Reduced Phosphorus Compounds. *Annu Rev Microbiol* 61:379–400. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093357
- Yao M, Henny C, Maresca JA (2016) Freshwater Bacteria Release Methane as a By-Product of Phosphorus Acquisition. *Appl Environ Microbiol* 82:6994–7003. doi: 10.1128/aem.02399-16
- Yakovleva GM, Kim SK, Wanner BL (1998) Phosphate-independent expression of the carbon-phosphorus lyase activity of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:573–578. doi: 10.1007/s002530051215